

## PCT COOPERATION TREATY

PCT

## NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Assistant Commissioner for Patents  
 United States Patent and Trademark  
 Office  
 Box PCT  
 Washington, D.C.20231  
 ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE

in its capacity as elected Office

|   |   |
|---|---|
| Date of mailing (day/month/year)<br>19 October 1999 (19.10.99)            |   |
| International application No.<br>PCT/EP99/01017                           | Applicant's or agent's file reference<br>L07839 L.P.1778      |
| International filing date (day/month/year)<br>18 February 1999 (18.02.99) | Priority date (day/month/year)<br>18 February 1998 (18.02.98) |
| Applicant<br>PETERSEN, Michael et al                                      |   |

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

13 August 1999 (13.08.99)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:2. The election ☒ was☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

|   |   |
|---|---|
| The International Bureau of WIPO<br>34, chemin des Colombettes<br>1211 Geneva 20, Switzerland<br><br>Facsimile No.: (41-22) 740.14.35 | Authorized officer<br><br>Aino Metcalfe<br><br>Telephone No.: (41-22) 338.83.38 |
|---|---|



(11) Publication number: **0 577 446 A2**

(12)

# EUROPEAN PATENT APPLICATION

(21) Application number: 93401344.2

(51) Int. Cl.<sup>5</sup>: **C12P 41/00, C12P 7/04, C12P 7/22, C12P 7/62**

(22) Date of filing: 26.05.93

(30) Priority: 28.05.92 JP 162140/92

(43) Date of publication of application: 05.01.94 Bulletin 94/01

(84) Designated Contracting States: DE FR GB

(71) Applicant: Showa Shell Sekiyu Kabushiki Kaisha  
2-5, Kasumigaseki 3-chome Chiyoda-ku Tokyo (JP)

(72) Inventor: Miyazawa, Toshifumi  
2-12-2, Kitaochiai, Suma-ku Kobe-shi, Hyogo 654-01 (JP)  
Inventor: Hirose, Katutoshi, c/o KOBE NATURAL PRODUCT  
CHEMICAL CO., LTD., 10-6, Kamishinchi 3-chome  
Nishi-ku, Kobe-shi, Hyogo 674 (JP)

Inventor: Takagi, Yoshihiro, c/o KOBE NATURAL PRODUCT  
CHEMICAL CO., LTD., 10-6, Kamishinchi 3-chome  
Nishi-ku, Kobe-shi, Hyogo 674 (JP)  
Inventor: Otomatsu, Toshihiko, c/o KOBE NATURAL PRODUCT  
CHEMICAL CO., LTD., 10-6, Kamishinchi 3-chome  
Nishi-ku, Kobe-shi, Hyogo 674 (JP)  
Inventor: Kurita, Sota, c/o KOBE NATURAL PRODUCT  
CHEMICAL CO., LTD., 10-6, Kamishinchi 3-chome  
Nishi-ku, Kobe-shi, Hyogo 674 (JP)  
Inventor: Suzuki, Yoshitichi, c/o SHOWA SHELL SEKIYU K.K.  
2-5, Kasumigaseki 3-chome, Chiyoda-ku 3-chome  
Tokyo 100 (JP)  
Inventor: Nishikawa, Koujiro  
10-3, Tamondai 2-chome, Tarumi-ku Kobe-shi, Hyogo 655 (JP)

(74) Representative: Bourgognon, Jean-Marie et al  
Cabinet Flechner 22, Avenue de Friedland F-75008 Paris (FR)

(54) Process for preparing optically active halogen-containing alcohols.

(57) Optically active, halogen-containing alcohols useful as intermediate of liquid crystal compounds are prepared in which an enzyme originated from microorganisms selected from the genera of Chromobacterium, Alcaligenes, Candida, Geotrichum, Humicola, Mucor, Penicillium, Rhizopus and Pseudomonas or an enzyme originated from wheat malt, such as wheat germ, is allowed to react, in organic solvents, with a racemic, halogen-containing alcohol of the formula [I]:



wherein R<sub>1</sub> is a halogen-containing alkyl group having 1 to 4 carbon atoms; and R<sub>2</sub> is a group selected from alkyl and aralkyl groups having 4 to 16 carbon atoms, substituted and unsubstituted aryl groups and -CH<sub>2</sub>-COO-R<sub>5</sub> wherein R<sub>5</sub> is an alkyl or aralkyl group having 2 to 16 carbon atoms, and a vinyl ester of the formula [II]:



wherein R<sub>3</sub> is an alkyl, substituted alkyl or alkenyl group having 1 to 11 carbon atoms; and R<sub>4</sub> is a substituted or unsubstituted vinyl group having 2 to 4 carbon atoms, until the corresponding (S)-type or (R)-type isomer of the compound [I] is obtained.

EP 0 577 446 A2

The present invention relates to a process for preparing a halogen-containing alcohol of high optical purity by subjecting a vinyl ester and a racemic, halogen-containing alcohol to an asymmetric esterification reaction using an esterase. The optically active, halogen-containing alcohols of the invention are useful as intermediates for liquid crystal materials, pharmaceuticals, pesticides and others.

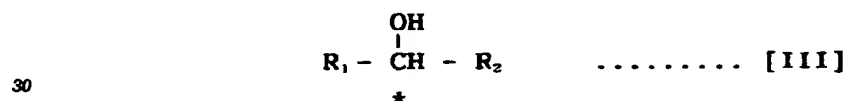
5 Methods for preparing optically active, halogen-containing alcohols involve asymmetric syntheses through an organic synthetic reaction and optical resolutions using a diastereomer. However, these methods have much difficulties in obtaining products of high optical purity and in synthesizing them in a large amount, so that established practical methods are few. Optical resolution methods have also been reported by the present inventors in Japanese Patent [KOKAI] Publications Nos. 282340/1990, 233243/1989 and 233244/1989. These  
10 methods pertain to enzymatic reactions in an aqueous solution, which have certain problems from technical points of view, for example, inferior dispersibility of substrates, and difficulties in obtaining a high optical yield, in synthesizing in a large scale, and in separating and recovering enzymes.

To overcome these technical problems, asymmetric enzymatic reaction in an organic solvent has been focused recently. This method has also difficulties in not being able to attain high optical purity because of a  
15 partial reverse reaction due to reversibility of esterification reaction.

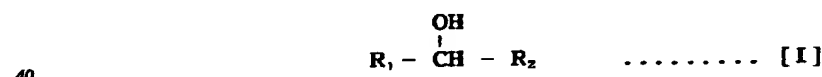
More recently, there has been reported that high optical purity is attained by an irreversible esterification reaction using a vinyl ester derivative (J. Org. Chem., 1988, 53, 3127-3219). However, nothing was reported on halogen-containing alcohols, except that an optical resolution through ester-exchanging reaction of a trifluoromethyl group-containing alcohol with a vinyl ester using Lipase P originated from *Pseudomonas* sp. was  
20 tried. In this case, however, the reaction hardly proceeds and no optical resolution is attained (J. Chem. Soc., Chem. Commun., 1988, 1459-1461, particularly Table 1).

An object of the present invention is to provide a novel process for efficiently preparing an optically active, halogen-containing alcohol from the corresponding racemic, halogen-containing alcohol in organic solvents.

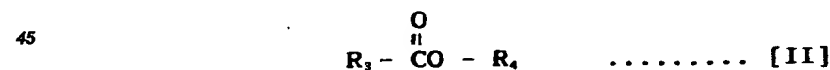
The first aspect of the present invention relates to a process for preparing an optically active or enantiomeric halogen-containing alcohol represented by the formula [III]:  
25



wherein  $R_1$  is a halogen-containing alkyl group having 1 to 4 carbon atoms;  $R_2$  is a group selected from alkyl and aralkyl groups having 4 to 16 carbon atoms, substituted and unsubstituted aryl groups and  $-CH_2COO-R_6$ ,  
35 wherein  $R_6$  is an alkyl or aralkyl group having 2 to 16 carbon atoms; and \* means an asymmetric carbon atom, which is characterized by subjecting a racemic, halogen-containing alcohol represented by the formula [I]:



wherein  $R_1$  and  $R_2$  have the same meanings as above, and a vinyl ester represented by the formula [II]:



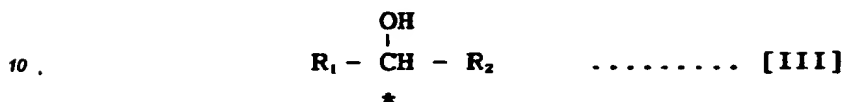
wherein  $R_3$  is an alkyl, substituted alkyl or alkenyl group having 1 to 11 carbon atoms; and  $R_4$  is a substituted or unsubstituted vinyl group having 2 to 4 carbon atoms, to an asymmetric esterification reaction in organic solvents through action of an enzyme originated from microorganisms selected from the group consisting of genera of

55 Chromobacterium  
Alcaligenes  
Candida  
Geotrichum  
Humicola  
Mucor

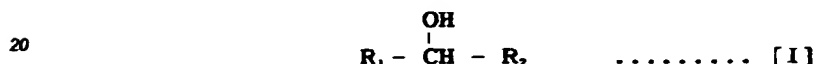
PenicilliumRhizopusPseudomonas sp.

or an enzyme originated from wheat malt, such as wheat germ.

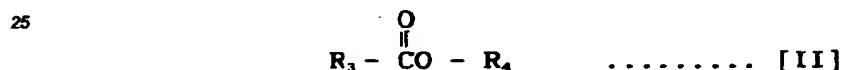
5 The second aspect of the present invention relates to a process for preparing an optically active or enantiomeric halogen-containing alcohol represented by the formula [III]:



15 wherein  $\text{R}_1$  is a halogen-containing alkyl group having 1 to 4 carbon atoms;  $\text{R}_2$  is a group selected from alkyl and aralkyl groups having 4 to 16 carbon atoms, substituted and unsubstituted aryl groups and  $-\text{CH}_2\text{COO}-\text{R}_5$  wherein  $\text{R}_5$  is an alkyl or aralkyl group having 2 to 16 carbon atoms; and \* means an asymmetric carbon atom, which is characterized by subjecting a racemic, halogen-containing alcohol represented by the formula [I]:



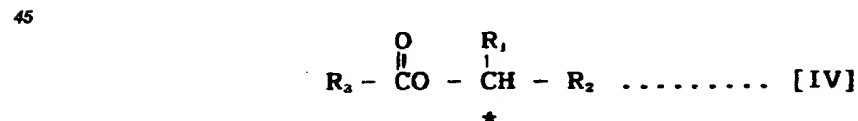
wherein  $\text{R}_1$  and  $\text{R}_2$  have the same meanings as above, and a vinyl ester represented by the formula [II]:



30 wherein  $\text{R}_3$  is an alkyl, substituted alkyl or alkenyl group having 1 to 11 carbon atoms; and  $\text{R}_4$  is a substituted or unsubstituted vinyl group having 2 to 4 carbon atoms, to an asymmetric ester-exchanging reaction in organic solvents through action of an enzyme originated from microorganisms selected from the group consisting of genera of

ChromobacteriumAlcaligenes35 CandidaGeotrichumHumicolaMucorPenicillium40 RhizopusPseudomonas sp.

or an enzyme originated from wheat malt, such as wheat germ, to obtain an optically active, halogen-containing ester represented by the formula [IV]:

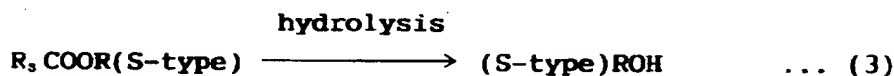
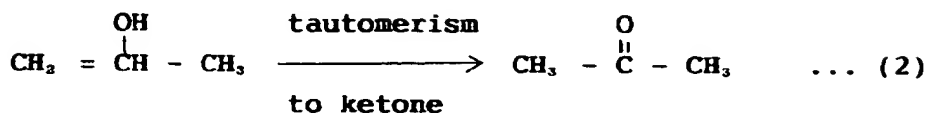


50 wherein  $\text{R}_1$ ,  $\text{R}_2$  and  $\text{R}_3$  have the same meanings as above and \* means an asymmetric carbon atom, and separating and then hydrolyzing said ester.

The present invention is summarized according to the following reaction formulas (1), (2) and (3):

55





(wherein R represents an



group.)

In the above reaction formulas, the product, ROH, in the formula (1) is shown as (R)-type, and the product, ROH, in the formula (3) is shown as (S)-type. However, which the products in the formulas (1) and (3) are (R)-type or (S)-type, depends upon an enzyme employed. For the convenience of explanation, herein, the product in the formula (1) is referred to (R)-type, and that in the formula (3), (S)-type.

If the ester component in the reaction does not have a vinyl group, the reaction in the formula (1) essentially proceeds reversibly, so that (S)-type  $R_3COOR$  once formed causes again a reverse esterification reaction, by which optical purity is lowered. If the ester component contains a vinyl group, the vinyl alcohol component formed in the formula (1) causes tautomerism to a ketone or aldehyde as shown in the formula (2), thus, no reversible reaction of the formula (1) occurs. Accordingly, decrease in optical purity of the formed (R)-type ROH is prevented.

$R_1$  in the formula [III] includes  $CH_2F$ ,  $CHF_2$ ,  $CF_3$ ,  $CClF_2$ ,  $CCl_2F$ ,  $CF_3CCl_2$ ,  $C_2F_5$  and  $C_3F_7$ .

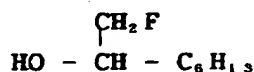
$R_2$  in the formula [III] includes straight chain or branched alkyl groups, such as n-butyl, isobutyl, n-pentyl, 2-methylbutyl and n-hexyl groups; phenyl and substituted phenyl groups, such as tolyl and xylyl groups; and benzyl and phenethyl groups.

$R_3$  includes alkyl groups, such as methyl, ethyl, n-propyl, n-butyl, isobutyl, n-hexyl, n-octyl and n-decyl groups; substituted alkyl groups, such as monochloromethyl, monobromomethyl, monochloroethyl and monochloropropyl groups; and alkenyl groups, such as  $CH_2=CH-$ ,  $CH_3CH=CH-$ ,  $CH_2=C(CH_3)-$ ,  $CH_3CH=CHCH=CH-$  and  $CH_2=CH-(CH_2)_8-$ .

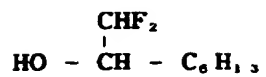
$R_4$  includes vinyl, isopropenyl and n-butenyl groups.

$R_5$  includes ethyl, propyl, n-butyl, isobutyl, n-hexyl, n-octyl, n-decyl, n-hexadecyl and benzyl groups.

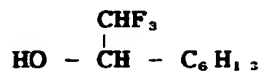
Compounds represented by the formula [I] include the following ones:



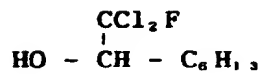
5



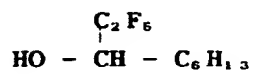
10



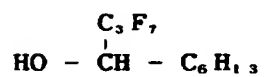
15



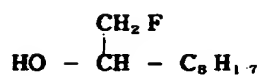
20



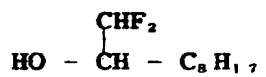
25



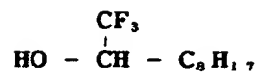
30



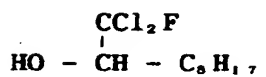
35



40

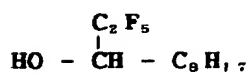


45

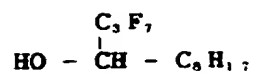


50

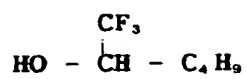
55



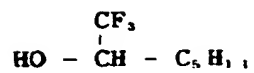
5



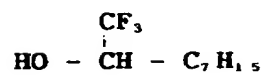
10



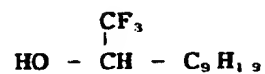
15



20



25



30

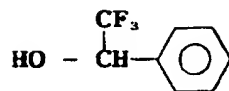


35

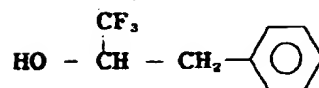


40

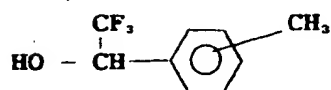
45

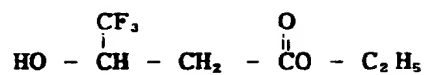


50

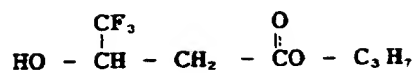


55

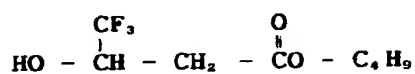




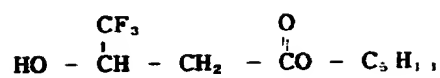
5



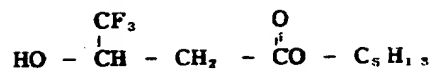
10



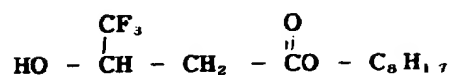
15



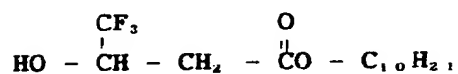
20



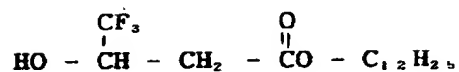
25



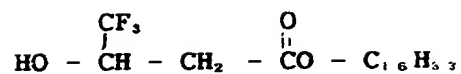
30



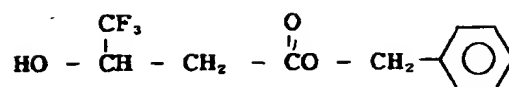
35



40

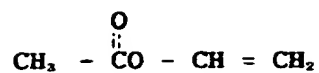


45

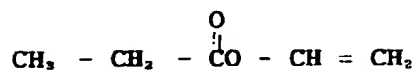


50

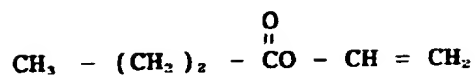
55 Compounds represented by the formula [II] include the following ones:



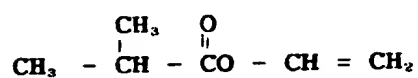
5



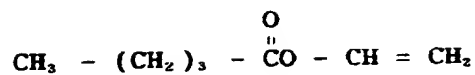
10



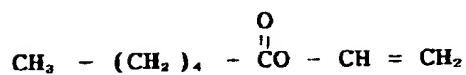
15



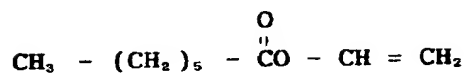
20



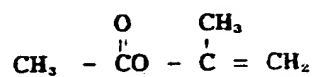
25



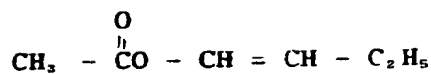
30



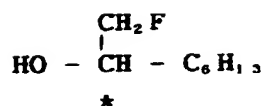
35



40



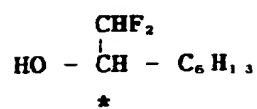
45



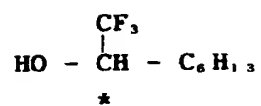
50

55

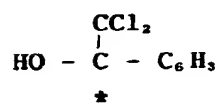
5



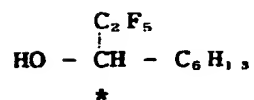
10



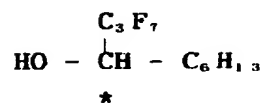
15



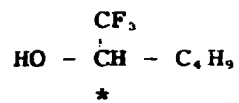
20



25

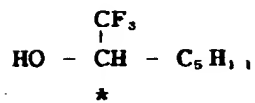


30



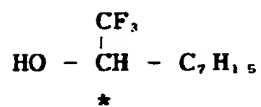
35

40



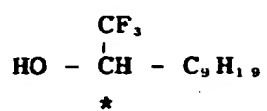
45

50

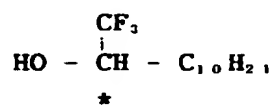


55

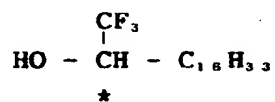
5



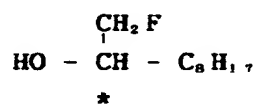
10



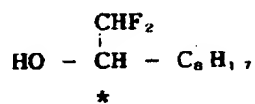
15



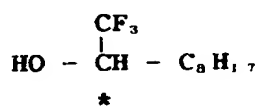
20



25

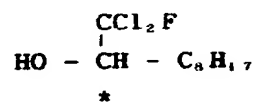


30



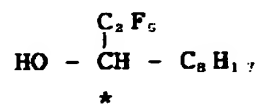
35

40



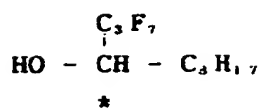
45

50

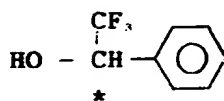


55

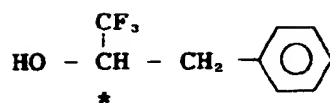
5



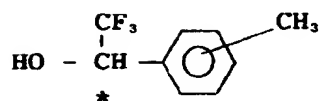
10



15

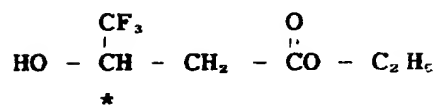


20

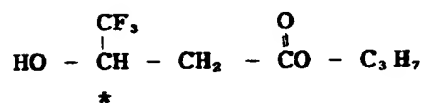


25

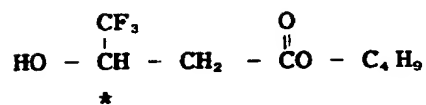
30



35

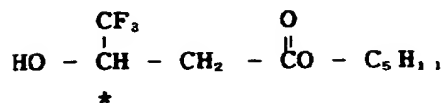


40



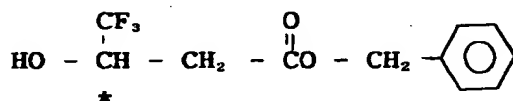
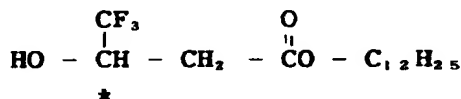
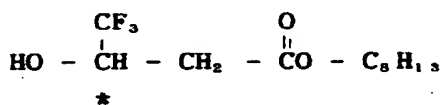
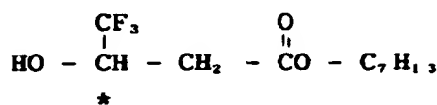
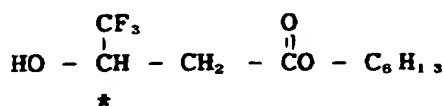
45

50



55





Organic solvents employed in the invention include aliphatic hydrocarbons having 5 to 10 carbon atoms, for example, n-hexane and n-heptane; alicyclic hydrocarbons having 6 to 9 carbon atoms, for example, cyclohexane; aromatic hydrocarbons having 7 to 9 carbon atoms, for example, toluene; ether solvents, for example, diethyl ether, diisopropyl ether and tetrahydrofuran; and chlorinated aliphatic hydrocarbons having 1 or 2 carbon atoms, for example, 1,2-dichloroethane and chloroform, among which the chlorinated solvents are preferred.

Enzymes in the present invention, which are to be used for optical resolution through an asymmetric ester-exchanging reaction in an organic solvent, should be those which accelerate the asymmetric ester-exchanging reaction without being deactivated in organic solvents.

As a result of extensive studies, the present inventors have found that enzymes mentioned in Table 1 exhibit efficient optical resolution performance for the asymmetric ester-exchanging reaction of vinyl esters and halogen-containing alcohols in organic solvents, thereby to obtain the halogen-containing alcohols of high optical purity.

Namely, enzymes employed in the process of the invention include those originated from microorganisms selected from the group consisting of genera of

Chromobacterium

Alcaligenes

Candida

Geotrichum

Humicola

Mucor

Penicillium

Rhizopus

Pseudomonas sp.

and those originated from wheat malt, such as wheat germ. Enzymes other than those illustrated above may be used so far as they are active for the asymmetric ester-exchanging reaction in organic solvents. Particularly preferable are those mentioned in Table 1.

Table 1

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

| Origins                         | Tradenames                                | Manufactures |
|---------------------------------|---|--------------|
| <u>Chromobacterium viscosum</u> | Lipase LP                                 | Asahi Kasei  |
| <u>Alcaligenes sp.</u>          | <u>Alcaligenes sp.</u> Lipase             | Cosmo Bio    |
| <u>Candida cylindracea</u>      | Lipase Type VII                           | SIGMA        |
| <u>Candida cylindracea</u>      | Lipase OF-360                             | Meito Sangyo |
| <u>Candida lipolytica</u>       | Lipase from <u>Candida lipolytica</u>     | Fluka        |
| <u>Geotrichum candidum</u>      | <u>Geotrichum candidum</u> Lipase         | Cosmo Bio    |
| <u>Humicola lanuginosa</u>      | <u>Humicola lanuginosa</u> Lipase         | Cosmo Bio    |
| <u>Mucor miehei</u>             | Mucor Lipase M                            | Cosmo Bio    |
| <u>Penicillium cyclopium</u>    | <u>Penicillium</u> Lipase C               | Cosmo Bio    |
| <u>Penicillium roqueforti</u>   | Lipase from <u>Penicillium roqueforti</u> | Fluka        |
| <u>Rhizopus arrhizus</u>        | Lipase Type XI                            | SIGMA        |
| <u>Rhizopus delemar</u>         | Lipase from <u>Rhizopus delemar</u>       | Fluka        |
| <u>Rhizopus niveus</u>          | Lipase from <u>Rhizopus niveus</u>        | Fluka        |
| Wheat germ                      | Lipase Type I                             | SIGMA        |
| <u>Pseudomonas sp.</u>          | Lipase SAM-II                             | Fluka        |
| <u>Pseudomonas Sp.</u>          | Lipase Type XIII                          | SIGMA        |

Amount of the enzyme used is preferably not less than 20% by weight, more preferably 35 to 65% by weight, per the reaction substrate. Even an amount as small as 5% by weight accelerates the reaction, but such a case needs a longer period of time, for example, 300 to 600 hours.

Reaction temperature may normally be a temperature at which the enzyme is not deactivated, namely, a temperature within the range of 20 to 70°C, preferably, 50 to 60°C. The optimum temperature varies depending upon each enzyme employed.

The reaction period of time is not limitative, but generally within the range of 1 to 300 hours.

Optimum asymmetric ester-exchanging ratio to obtain a high optical purity in the present invention varies depending upon the combination of enzymes and substrates. In case of a combination of pentafluoro-2-alkanol and Lipase LP, for example, a high optical purity of not less than 90% is obtained if the reaction is ceased at an exchanging ratio of not less than 50%, preferably 55 to 60% or more. A high ester exchanging ratio is possible, but it tends to decrease yield.

The ester-exchanging ratio may be measured by assaying directly the reaction mixture using a gas chromatography

#### Conditions for gas chromatography

Column: SE-30

Initial temperature: 250°C

Column temperature: 130°C

Detector: FID

Injecting 3  $\mu$ l of the reaction mixture.

When a resolved optically active, halogen-containing alcohol is obtained according to the present reaction,

its enantiomer remains in the reaction system in the form of an ester. Thus, the enantiomer which is an optically active antipode is obtained by separating and recovering the ester and subjecting it to hydrolysis with an alkali.

Procedures for determining optical purity in the present invention are as follows.

About 5 mg of a sample alcohol is weighted, and dissolved in 0.5 ml of dry toluene. A mixture of the solution with about 5 mg of 3,5-dinitrophenyl isocyanate is subjected to pulverization and then mixed with about 5 to 10 mg of 4-dimethylaminopyridine. The mixture is stirred for 1 hour at 60 to 70°C, and then concentrated at 60 to 70°C. The residue is dissolved in about 15 ml of ethyl ether, washed sequentially with 1 M HCl twice, H<sub>2</sub>O, 1 M NaHCO<sub>3</sub> and saturated NaCl solution, and dried over anhydrous sodium sulfate. The ether layer in about 8 µl volume is assayed using high pressure liquid chromatography (HPLC).

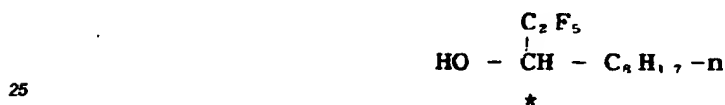
10

#### Conditions for HPLC

Column: SUMICHIRAL OA-4000  
 Solvent: n-Hexane: CHCl<sub>3</sub>: IPA = 50 : 30 : 1  
 15 Flowing amount: 1 ml/min.  
 Detection wave length: 254 nm

The invention will more fully be explained with respect to examples, which are, however, never construed to limit the invention.

20 Part 1: Examples for optical resolution reaction of 1,1,1,2,2-pentafluoro-3-undecanyl alcohol:



25

#### Example 1

30 To 30 ml of n-hexane were added 2.4 g of 1,1,1,2,2-pentafluoro-3-undecanyl alcohol, 3 g of vinyl butyrate and 750 mg of Lipase LP originated from *Chromobacterium viscosum*, made by Asahi Kasei. The mixture was well stirred to keep a dispersion for 72 hours at 30°C to proceed with a reaction. Process of the reaction was pursued by checking ester-exchanging ratio every 8 hours using a gas chromatography. When the exchanging ratio reached 65%, the reaction was ceased by removing the lipase through a suction filtration. The filtrate was concentrated and then subjected to a silica gel column chromatography wherein n-hexane/isopropyl ether = 5/1 by volume was used, for separation and purification. The first fraction obtained was an ester, and the second fraction was 0.61 g of the titled optically active 1,1,1,2,2-pentafluoro-3-undecanyl alcohol.

35 NMR (CDCl<sub>3</sub> δ TMS inner standard)

0.84 (3H t J = 6.7 Hz)  
 40 1.1 - 1.43 (12H m)  
 1.45 - 1.62 (2H m)  
 1.63 - 1.75 (1H m)  
 3.87 - 4.20 (1H m)

HPLC analysis in the form of 3,5-dinitrophenyl isocyanate derivative showed that it was the (R) isomer with an optical purity of 86% e.e.

45

#### Example 2

Procedures in Example 1 were repeated except that 3 g of vinyl acetate was used in place of the vinyl butyrate. After 48 hour reaction at an exchanging ratio of 50%, the resulting optically active alcohol had an optical purity of 39% e.e.

50

#### Example 3

55 Procedures in Example 1 were repeated except that 3 g of vinyl propionate was used in place of the vinyl butyrate. After 20 hour reaction at an exchanging ratio of 64%, the resulting optically active alcohol had an optical purity of 93.5% e.e.

## Example 4

Procedures in Example 2 were repeated except that the same amount of diisopropyl ether was used as the solvent in place of the n-hexane. After 168 hour reaction at an exchanging ratio of 54%, the resulting optically active alcohol had an optical purity of 65% e.e.

## Example 5

Procedures in Example 1 were repeated except that the 3 g of vinyl propionate as the ester and 30 ml of 1,2-dichloroethane as the solvent were used in place of the vinyl butyrate and n-hexane, respectively, at a reaction temperature 50°C. After 90 hour reaction at an exchanging ratio of 58%, the resulting optically active alcohol had an optical purity of 97.6% e.e.

## Example 6

Procedures in Example 5 were repeated except that 30 ml of tetrahydrofuran (THF) was used as the solvent in place of the 1,2-dichloroethane. After 383 hour reaction at an exchanging ratio of 59%, the resulting optically active alcohol had an optical purity of 90% e.e.

## Example 7

Procedures in Example 5 were repeated except that the same amount of n-hexane was used as the solvent in place of the 1,2-dichloroethane. After 116 hour reaction at an exchanging ratio of 62%, the resulting optically active alcohol had an optical purity of 72% e.e.

## Example 8

Procedures in Example 7 were repeated except that 750 mg of Lipase Type XIII originated from *Pseudomonas* sp., made by SIGMA, was used in place of the Lipase LP. After 330 hour reaction at an exchanging ratio of 64%, the resulting optically active alcohol had an optical purity of 9.6% e.e.

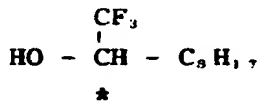
## Example 9

Procedures in Example 5 were repeated except that 750 mg of Lipase SAM-II originated from *Pseudomonas* sp., made by Fluka, was used in place of the Lipase LP. After 330 hour reaction at an exchanging ratio of 46%, the resulting optically active alcohol had an optical purity of 28.8% e.e.

## Example 10

Procedures in Example 5 were repeated except that 750 mg of Lipase Type VII originated from *Candida cylindracea*, made by SIGMA, was used in place of the Lipase LP. After 330 hour reaction at an exchanging ratio of 6%, the resulting optically active alcohol had an optical purity of 5.1% e.e.

Part 2: Examples for optical resolution reaction of 1,1,1-trifluoro-2-decanol:



## Example 11

To 30 ml of chloroform were added 2.4 g of 1,1,1-trifluoro-2-decanol, 3 g of vinyl propionate and 750 mg of Lipase LP originated from *Chromobacterium viscosum*, made by Asahi Kasei. The mixture was well stirred to keep a dispersion for 70 hours at 5°C to proceed with a reaction. Process of the reaction was pursued by checking ester-exchanging ratio every 8 hours using a gas chromatography. The reaction was ceased at an exchanging ratio of 76% by removing the lipase through a suction filtration. The filtrate was concentrated and subjected to a silica gel chromatography wherein n-hexane/isopropyl ether = 5/1 by volume was used, for sep-

aration and purification. The first fraction obtained was an ester, and the second fraction was 0.45 g of the titled optically active 1,1,1-trifluoro-2-decanol alcohol.

NMR (CDCl<sub>3</sub> δ TMS inner standard)

0.86 (3H t J = 7.0 Hz)

5 1.20 - 1.40 (11H m)

1.45 - 1.60 (2H m)

1.60 - 1.70 (1H m)

3.70 - 3.85 (2H m)

10 HPLC analysis in the form of 3,5-dinitrophenyl isocyanate derivative showed that it was the (R) isomer with an optical purity of 95% e.e.

#### Example 12

15 Procedures in Example 11 were repeated except that 30 ml of tetrahydrofuran (THF) was used as the solvent in place of the chloroform. After 95 hour reaction at an exchanging ratio of 75% , the resulting optically active alcohol had an optical purity of 82% e.e.

#### Example 13

20 Procedures in Example 11 were repeated except that 30 ml of toluene was used as the solvent in place of the chloroform. After 95 hour reaction at an exchanging ratio of 78%, the resulting optically active alcohol had an optical purity of 81% e.e.

#### Example 14

25 Procedures in Example 11 were repeated except that 30 ml of hexane was used as the solvent in place of the chloroform. After 70 hour reaction at an exchanging ratio of 72%, the resulting optically active alcohol had an optical purity of 60% e.e.

30 Part 3: Examples for optical resolution reaction of 1,1,1,2,2,3,3-heptafluoro-4-decanol:



#### Example 15

40 To 20 ml of 1,2-dichloroethane were added 870 mg of 1,1,1,2,2,3,3-heptafluoro-4-decanol, 1 g of vinyl propionate and 290 mg of Lipase LP originated from Chromobacterium viscosum, made by Asahi Kasei. The mixture was well stirred to keep a dispersion at 50°C for 72 hours to proceed with a reaction. Process of the reaction was pursued by checking ester-exchanging ratio every 8 hours using a gas chromatography. When the exchanging ratio reached 63%, the reaction was ceased by removing the lipase through a suction filtration. The filtrate was concentrated and subjected to a silica gel chromatography wherein n-hexane/isopropyl ether = 5/1 by volume was used, for separation and purification. The first fraction obtained was an ester, and the second fraction was 160 mg of the titled optically active 1,1,1,2,2,3,3-heptafluoro-4-decanol alcohol.

45 HPLC analysis in the form of 3,5-dinitrophenyl isocyanate derivative showed that it was the (R) isomer with an optical purity of 46.5% e.e.

50

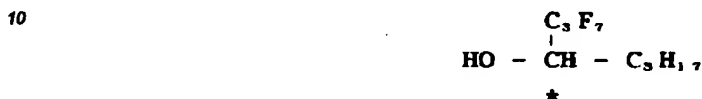
#### Example 16

55 Procedures in Example 15 were repeated except that 860 mg of vinyl acetate in place of the vinyl propionate, and 550 mg of the same Lipase LP were used. After 53 hour reaction at an exchanging ratio of 63%, the resulting optically active alcohol had an optical purity of 34.1% e.e.

## Example 17

Procedures in Example 15 were repeated except that 1 g of Lipase SMA-II originated from Pseudomonas sp., made by Fluka, was used, in place of the Lipase LP. After 95 hour reaction at an exchanging ratio of 6.9%,  
 5 the resulting optically active alcohol had an optical purity of 2.3% e.e.

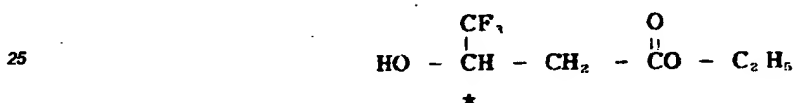
Part 4: Examples for optical resolution reaction of 1,1,1,2,2,3,3-heptafluoro-4-dodecanol:



## 15 Example 18

Procedures in Example 15 were repeated except that 950 mg of 1,1,1,2,2,3,3-heptafluoro-4-dodecanol was used in place of the 1,1,1,2,2,3,3-heptafluoro-4-decanol. After 75 hour reaction at an exchanging ratio of  
 20 64.5%, the resulting optically active alcohol had an optical purity of 46.8% ee.

Part 5: Examples for optical resolution reaction of ethyl 4,4,4-trifluoro-3-hydroxybutyrate:



## 30 Example 19

To 20 ml of 1,2-dichloroethane were added 530 mg of ethyl 4,4,4-trifluoro-3-hydroxybutyrate, 1 g of vinyl propionate and 290 mg of Lipase LP originated from Chromobacterium viscosum, made by Asahi Kasei. The mixture was well stirred to keep a dispersion at 50°C for 11 hours to proceed with a reaction. The reaction was  
 35 ceased at an exchanging ratio of 52.9% by removing the lipase through a suction filtration. The filtrate was concentrated and subjected to a silica gel chromatography wherein n-hexane/isopropyl ether = 5/1 by volume was used, for separation and purification to obtain 130 mg of optically active ethyl 4,4,4-trifluoro-3-hydroxybutyrate.

HPLC analysis in the form of 3,5-dinitrophenyl isocyanate derivative showed that its optical purity was  
 40 1.8% e.e.

## Example 20

Procedures in Example 19 were repeated except that Lipase SAM-II originated from Pseudomonas sp., made by Fluka, was used in place of the Lipase LP. After 169 hour reaction at an exchanging ratio of 61.9%,  
 45 the resulting optically active ethyl 4,4,4-trifluoro-2-hydroxybutyrate had an optical purity of 74% e.e.

## Example 21

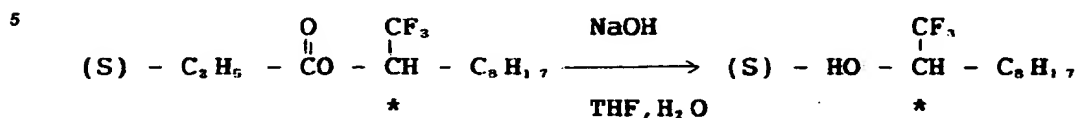
Procedures in Example 19 were repeated except that 750 mg of Lipase OF-360 made by MEITO SANGYO was used, in place of the Lipase LP. After 170 hour reaction at an exchanging ratio of 5.3%, the resulting  
 50 optically active ethyl 4,4,4-trifluoro-3-hydroxybutyrate had an optical purity of 0.5% e.e.

## Example 22

55 To 30 ml of THF-water (1 : 1) was dissolved 1.63 g of 1,1,1-trifluoro-2-decyl propionate, which had been obtained as the first fraction in silica gel column chromatography in Example 11, and the solution was mixed with 0.27 g of sodium hydroxide. The mixture was stirred for 18 hours at 30°C. After addition of 100 ml of water, the reaction mixture was extracted with 50 ml of diethyl ether, and the ether layer was dried over anhydrous

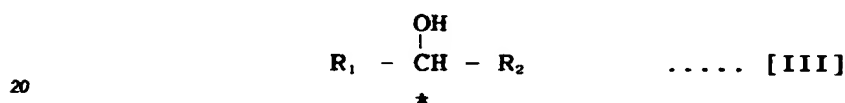
sodium sulfate. After removal of the solvent, 1.02 g of optically active 1,1,1-trifluoro-2-decanol was obtained.

HPLC analysis in the form of 3,5-dinitrophenyl isocyanate derivative showed it was (S) isomer with an optical purity of 31% e.e.

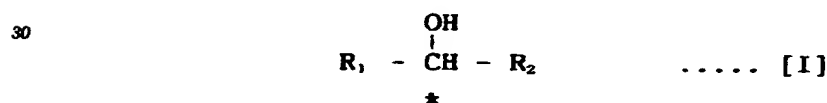


## Claims

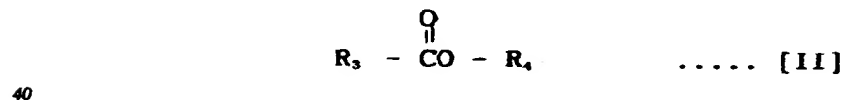
- 15 1. A process for preparing an optically active, halogen-containing alcohol represented by the formula [III]:



wherein R<sub>1</sub> is a halogen-containing alkyl group having 1 to 4 carbon atoms; R<sub>2</sub> is a group selected from alkyl and aralkyl groups having 4 to 16 carbon atoms, substituted and unsubstituted aryl groups and -CH<sub>2</sub>-COO-R<sub>5</sub> wherein R<sub>5</sub> is an alkyl or aralkyl group having 2 to 16 carbon atoms; and \* means an asymmetric carbon atom, which comprises subjecting a racemic, halogen-containing alcohol represented by the formula III:



35 wherein R<sub>1</sub> and R<sub>2</sub> have the same meanings as above, and a vinyl ester represented by the formula [II]:



wherein R<sub>3</sub> is an alkyl, substituted alkyl or alkenyl group having 1 to 11 carbon atoms; and R<sub>4</sub> is a substituted or unsubstituted vinyl group having 2 to 4 carbon atoms, to an asymmetric esterification reaction in organic solvents through action of an enzyme originated from microorganisms selected from the group consisting of genera of

50

|                        |  |
|------------------------|--|
| <u>Chromobacterium</u> |  |
| <u>Alcaligenes</u>     |  |
| <u>Candida</u>         |  |
| <u>Geotrichum</u>      |  |
| <u>Humicola</u>        |  |
| <u>Mucor</u>           |  |
| <u>Penicillium</u>     |  |
| <u>Rhizopus</u>        |  |
| <u>Pseudomonas sp.</u> |  |

- 55 or an enzyme originated from wheat malt.

- 2. A process for preparing an optically active, halogen-containing alcohol represented by the formula [III]:**



wherein R<sub>1</sub> is a halogen-containing alkyl group having 1 to 4 carbon atoms; R<sub>2</sub> is a group selected from alkyl and aralkyl groups having 4 to 16 carbon atoms, substituted and unsubstituted aryl groups and -CH<sub>2</sub>-COO-R<sub>6</sub> wherein R<sub>6</sub> is an alkyl or aralkyl group having 2 to 16 carbon atoms; and \* means an asymmetric carbon atom, which comprises subjecting a racemic, halogen-containing alcohol represented by the formula [I]:



wherein R<sub>1</sub> and R<sub>2</sub> have the same meanings as above, and a vinyl ester represented by the formula [II]:



wherein R<sub>3</sub> is an alkyl, substituted alkyl or alkenyl group having 1 to 11 carbon atoms; and R<sub>4</sub> is a substituted or unsubstituted vinyl group having 2 to 4 carbon atoms, to an asymmetric ester-exchanging reaction in organic solvents through action of an enzyme originated from microorganisms selected from the group consisting of genera of

Chromobacterium

Alcaligenes

Candida

Geotrichum

Humicola

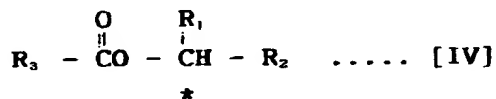
Mucor

Penicillium

Rhizopus

Pseudomonas sp.

or an enzyme originated from wheat malt, to obtain an optically active, halogen-containing ester represented by the formula [IV]:



wherein R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> and R<sub>3</sub> have the same meanings as above and \* means an asymmetric carbon atom, and separating and then hydrolyzing said ester.

3. A process for preparing optically active, halogen-containing alcohols according to Claim 1 or 2 wherein the organic solvents are aliphatic hydrocarbon solvents, alicyclic hydrocarbon solvents, aromatic hydrocarbon solvents, ether solvents, or chlorinated solvents.




 INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

|  |   |  |
|--|---|--|
| (51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> :<br><br>C12N 15/53, C12P 7/42, 7/62, 11/00,<br>13/02  | A1  | (11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/42590<br><br>(43) Internationales<br>Veröffentlichungsdatum: 26. August 1999 (26.08.99) |
| (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP99/01017<br><br>(22) Internationales Anmeldedatum: 18. Februar 1999 (18.02.99)<br><br>(30) Prioritätsdaten:<br>388/98 18. Februar 1998 (18.02.98) CH<br><br>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): LONZA<br>AG [CH/CH]; (Geschäftsleitung: 4002 Basel), CH-3945<br>Gampel (CH).<br><br>(72) Erfinder; und<br>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): PETERSEN, Michael<br>[DE/CH]; Sandstrasse 7, CH-3930 Visp (CH). BIRCH,<br>Olwen [GB/CH]; Weingartenweg 16, CH-3930 Visp<br>(CH). SHIMIZU, Sakayu [JP/JP]; Kyoto University,<br>Sakyo-Ku, Kyoto 606-8502 (JP). KIENER, Andreas<br>[CH/CH]; Meisenweg 5, CH-3930 Visp (CH). HISCHE, Marie-Luise<br>[CH/CH]; Sandstrasse 1, CH-3930 Visp (CH). THÖNI, Susanne<br>[CH/CH]; Bahnhofstrasse 3, CH-3904<br>Naters (CH).<br><br>(74) Anwälte: RITTHALER, Wolfgang usw.; Winter, Brandl &<br>Partner, Alois-Steinecker-Strasse 22, D-85354 Freising<br>(DE). | (81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG,<br>BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB,<br>GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG,<br>KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK,<br>MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG,<br>SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU,<br>ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG,<br>ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU,<br>TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK,<br>ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI<br>Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR,<br>NE, SN, TD, TG).<br><br>Veröffentlicht<br><i>Mit internationalem Recherchenbericht.<br/>Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen<br/>Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen<br/>eintreffen.<br/>Mit Angaben über hinterlegtes biologisches Material,<br/>eingereicht gemäss Regel 13bis getrennt von der<br/>Beschreibung.</i> |  |

(54) Title: METHOD FOR PRODUCING TRIFLUORO-3(R)-HYDROXYBUTYRIC ACID DERIVATIVES

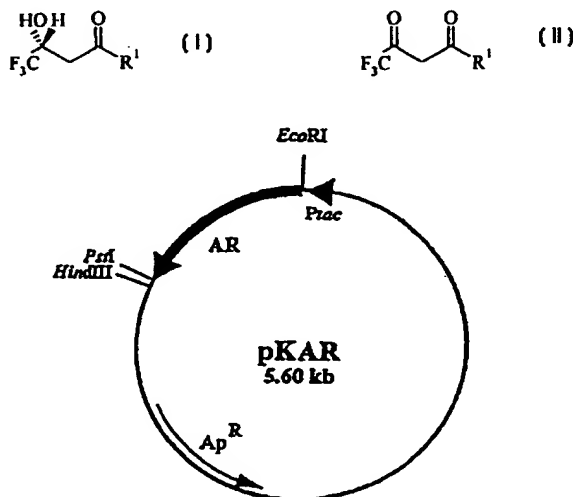
(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON TRIFLUOR-3(R)-HYDROXYBUTTERSÄUREDERIVATEN

## (57) Abstract

The invention relates to a biotechnological method for producing trifluoro-3(R)-hydroxybutyric acid derivatives of the general formula (I), where R<sup>1</sup> represents -OR<sup>2</sup>, where R<sup>2</sup> is hydrogen, C<sub>1-10</sub> alkyl, C<sub>1-10</sub> alkenyl, C<sub>3-8</sub> cycloalkyl, aryl, alkoxyalkyl or alkoxyalkoxyalkyl; -NR<sup>3</sup>R<sup>4</sup>, where R<sup>3</sup> and R<sup>4</sup> are the same or different and represent hydrogen, C<sub>1-10</sub> alkyl, C<sub>1-10</sub> alkenyl, C<sub>3-8</sub> cycloalkyl or aryl; or -SR<sup>5</sup>, where R<sup>5</sup> represents hydrogen, C<sub>1-10</sub> alkyl, C<sub>1-10</sub> alkenyl, aryl or C<sub>3-8</sub> cycloalkyl, based on a trifluoroacetoacetic acid derivative of the general formula (II), where R<sup>1</sup> has the meaning given above, by means of micro-organisms which are able to reduce a carbonyl function or by means of a cell-free enzyme extract of said micro-organisms.

## (57) Zusammenfassung

Beschrieben wird ein biotechnologisches Verfahren zur Herstellung von Trifluor-3(R)-hydroxybuttersäurederivaten der allgemeinen Formel (I), worin R<sup>1</sup>-OR<sup>2</sup>, worin R<sup>2</sup> Wasserstoff, C<sub>1-10</sub>-Alkyl, C<sub>1-10</sub>-Alkenyl, C<sub>3-8</sub> Cycloalkyl, Aryl, Alkoxyalkyl oder Alkoxyalkoxyalkyl ist, -NR<sup>3</sup>R<sup>4</sup>, worin R<sup>3</sup> und R<sup>4</sup> gleich oder verschieden sind und für Wasserstoff, C<sub>1-10</sub>-Alkyl, C<sub>1-10</sub>-Alkenyl, C<sub>3-8</sub>-Cycloalkyl oder Aryl stehen, oder -SR<sup>5</sup>, worin R<sup>5</sup> Wasserstoff, C<sub>1-10</sub>-Alkyl, C<sub>1-10</sub>-Alkenyl, Aryl oder C<sub>3-8</sub>-Cycloalkyl ist, bedeutet, ausgehend von einem Trifluoracetessigsäurederivat der allgemeinen Formel (II), worin R<sup>1</sup> die genannte Bedeutung hat, mittels Mikroorganismen, die befähigt sind, eine Carbonylfunktion zu reduzieren oder mittels einem zellfreien Enzymextrakt dieser Mikroorganismen.



# **LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

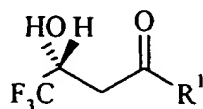
Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

|    |                              |    |                                   |    |   |    |                                |
|----|------------------------------|----|-----------------------------------|----|---|----|--------------------------------|
| AL | Albanien                     | ES | Spanien                           | LS | Lesotho   | SI | Slowenien                      |
| AM | Armenien                     | FI | Finnland                          | LT | Litauen   | SK | Slowakei                       |
| AT | Österreich                   | FR | Frankreich                        | LU | Luxemburg                                       | SN | Senegal                        |
| AU | Australien                   | GA | Gabun                             | LV | Lettland  | SZ | Swasiland                      |
| AZ | Aserbaidsschan               | GB | Vereinigtes Königreich            | MC | Monaco  | TD | Tschad                         |
| BA | Bosnien-Herzegowina          | GE | Georgien                          | MD | Republik Moldau                                 | TG | Togo                           |
| BB | Barbados                     | GH | Ghana                             | MG | Madagaskar                                      | TJ | Tadschikistan                  |
| BE | Belgien                      | GN | Guinea                            | MK | Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien | TM | Turkmenistan                   |
| BF | Burkina Faso                 | GR | Griechenland                      | ML | Mali  | TR | Türkei                         |
| BG | Bulgarien                    | HU | Ungarn                            | MN | Mongolei  | TT | Trinidad und Tobago            |
| BJ | Benin                        | IE | Irland                            | MR | Mauretanien                                     | UA | Ukraine                        |
| BR | Brasilien                    | IL | Israel                            | MW | Malawi  | UG | Uganda                         |
| BY | Belarus                      | IS | Island                            | MX | Mexiko  | US | Vereinigte Staaten von Amerika |
| CA | Kanada                       | IT | Italien                           | NE | Niger   | UZ | Usbekistan                     |
| CF | Zentralafrikanische Republik | JP | Japan                             | NL | Niederlande                                     | VN | Vietnam                        |
| CG | Kongo                        | KE | Kenia                             | NO | Norwegen  | YU | Jugoslawien                    |
| CH | Schweiz                      | KG | Kirgisistan                       | NZ | Neuseeland                                      | ZW | Zimbabwe                       |
| CI | Côte d'Ivoire                | KP | Demokratische Volksrepublik Korea | PL | Polen   |    |                                |
| CM | Kamerun                      | KR | Republik Korea                    | PT | Portugal  |    |                                |
| CN | China                        | KZ | Kasachstan                        | RO | Rumänien  |    |                                |
| CU | Kuba                         | LC | St. Lucia                         | RU | Russische Föderation                            |    |                                |
| CZ | Tschechische Republik        | LJ | Liechtenstein                     | SD | Sudan   |    |                                |
| DE | Deutschland                  | LK | Sri Lanka                         | SE | Schweden  |    |                                |
| DK | Dänemark                     | LR | Liberia                           | SG | Singapur  |    |                                |
| EE | Estland                      |    |                                   |    |   |    |                                |

## Verfahren zur Herstellung von Trifluor-3(R)-hydroxybuttersäurederivaten

Die Erfindung betrifft ein neues biotechnologisches Verfahren zur Herstellung von Trifluor-3(R)-hydroxybuttersäurederivaten der allgemeinen Formel

5



I

Trifluor-3(R)-hydroxybuttersäurederivate wie 4,4,4-Trifluor-3(R)-hydroxybuttersäureethylester sind wichtige Zwischenprodukte zur Herstellung von Pharmazeutika wie  
10 beispielsweise zur Herstellung von Befloxatone, einem Monoaminoxidase-A-Inhibitor (EP-A-0 736 606).

Zur Herstellung von 4,4,4-Trifluor-3(R)-hydroxybuttersäureester sind bereits mehrere biotechnologisches Verfahren bekannt.

15 Guerrero, A. & Raja, E. (Bioorganic Chemistry Letters 1(12), 675 – 678) beschreiben ein mikrobiologisches Verfahren zur Herstellung von 4,4,4-Trifluor-3(R)-hydroxybuttersäureethylester ausgehend von dem entsprechenden Racemat mittels *Saccharomyces cerevisiae*. Dabei wird das gewünschte Produkt in schlechter Enantiomeren-Reinheit erhalten.

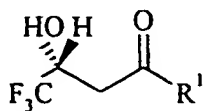
Die EP-A-0 736 606 beschreibt ein biotechnologisches Verfahren zur Herstellung von  
20 4,4,4-Trifluor-3(R)-hydroxybuttersäureethylester, ausgehend von 4,4,4-Trifluor-3-hydroxybuttersäureethylester mittels der Lipase Novozym 435. Nachteilig bei diesem Verfahren ist die mässige Ausbeute an dem gewünschten Produkt.

Die EP-A-0 577 446 umfasst ein biotechnologisches Verfahren zur Herstellung von optisch  
25 aktivem 4,4,4-Trifluor-3-hydroxybuttersäureethylester, ausgehend von dem entsprechenden racemischen Ester mittels Lipasen. Nach diesem Verfahren wird das Produkt in geringer Ausbeute und in schlechter optischer Reinheit erhalten.

Die WO 89/02 470 beschreibt ein Verfahren zur Herstellung von 4,4,4-Trifluor-3(R)-  
30 hydroxybuttersäureethylester, ausgehend von racemischem 4,4,4-Trifluor-3-acyloxy-

## Verfahren zur Herstellung von Trifluor-3(R)-hydroxybuttersäurederivaten

Die Erfindung betrifft ein neues biotechnologisches Verfahren zur Herstellung von Trifluor-3(R)-hydroxybuttersäurederivaten der allgemeinen Formel



Trifluor-3(R)-hydroxybuttersäurederivate wie 4,4,4-Trifluor-3(R)-hydroxybuttersäureethylester sind wichtige Zwischenprodukte zur Herstellung von Pharmazeutika wie beispielsweise zur Herstellung von Befloxatone, einem Monoaminoxidase-A-Inhibitor (EP-A-0 736 606).

Zur Herstellung von 4,4,4-Trifluor-3(R)-hydroxybuttersäureester sind bereits mehrere biotechnologisches Verfahren bekannt.

Guerrero, A. & Raja, E. (Bioorganic Chemistry Letters 1(12), 675 – 678) beschreiben ein mikrobiologisches Verfahren zur Herstellung von 4,4,4-Trifluor-3(R)-hydroxybuttersäureethylester ausgehend von dem entsprechenden Racemat mittels *Saccharomyces cerevisiae*. Dabei wird das gewünschte Produkt in schlechter Enantiomeren-Reinheit erhalten.

Die EP-A-0 736 606 beschreibt ein biotechnologisches Verfahren zur Herstellung von 4,4,4-Trifluor-3(R)-hydroxybuttersäureethylester, ausgehend von 4,4,4-Trifluor-3-hydroxybuttersäureethylester mittels der Lipase Novozym 435. Nachteilig bei diesem Verfahren ist die mässige Ausbeute an dem gewünschten Produkt.

Die EP-A-0 577 446 umfasst ein biotechnologisches Verfahren zur Herstellung von optisch aktivem 4,4,4-Trifluor-3-hydroxybuttersäureethylester, ausgehend von dem entsprechenden racemischen Ester mittels Lipasen. Nach diesem Verfahren wird das Produkt in geringer Ausbeute und in schlechter optischer Reinheit erhalten.

Die WO 89/02 470 beschreibt ein Verfahren zur Herstellung von 4,4,4-Trifluor-3(R)-hydroxybuttersäureethylester, ausgehend von racemischem 4,4,4-Trifluor-3-acyloxy-

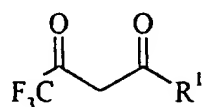
buttersäureethylester mittels hydrolytischen Enzymen. Dabei wird jedoch das entsprechende Produkt nicht in enantiomerenreiner Form erhalten.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es, ein biotechnologisches Verfahren zur Herstellung von 4,4,4-Trifluor-3(R)-hydroxybuttersäurederivaten zur Verfügung zu stellen, mit welchem das gewünschte Produkt in guter optischer Reinheit und mit guter Ausbeute isoliert werden kann.

Diese Aufgabe wird mit dem Verfahren nach Anspruch 1 gelöst.

10

Erfindungsgemäss wird das Verfahren derart durchgeführt, dass man ein Trifluoracetessigsäurederivat der allgemeinen Formel



II

15

worin

$\text{R}^1$   $-\text{OR}^2$ , worin  $\text{R}^2$  Wasserstoff,  $\text{C}_{1-10}$ -Alkyl,  $\text{C}_{1-10}$ -Alkenyl,  $\text{C}_{3-8}$ -Cycloalkyl, Aryl, Alkoxyalkyl oder Alkoxyalkoxyalkyl ist,

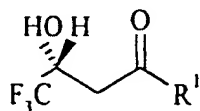
$-\text{NR}^3\text{R}^4$ , worin  $\text{R}^3$  und  $\text{R}^4$  gleich oder verschieden sind und für Wasserstoff,  $\text{C}_{1-10}$ -Alkyl,

$\text{C}_{1-10}$ -Alkenyl,  $\text{C}_{3-8}$ -Cycloalkyl oder Aryl stehen, oder

$-\text{SR}^5$ , worin  $\text{R}^5$  Wasserstoff,  $\text{C}_{1-10}$ -Alkyl,  $\text{C}_{1-10}$ -Alkenyl, Aryl oder  $\text{C}_{3-8}$ -Cycloalkyl ist, bedeutet,

mittels Mikroorganismen, die befähigt sind eine Carbonylfunktion zu reduzieren oder mittels

einem zellfreien Enzymextrakt dieser Mikroorganismen, in die Verbindung der allgemeinen Formel



I

worin R<sup>1</sup> die genannte Bedeutung hat, überführt.

Als C<sub>1-10</sub>-Alkyl kann im folgenden eine verzweigte oder unverzweigte primäre, sekundäre oder  
5 tertiäre aliphatische Gruppe wie Methyl, Ethyl, Propyl, Isopropyl, Butyl, Isobutyl, sec-Butyl, tert-Butyl, Pentyl, Isopentyl, sec-Pentyl, Hexyl, Heptyl, Octyl, Nonyl oder Decyl verwendet werden. Vorzugsweise bedeutet C<sub>1-10</sub>-Alkyl, Ethyl, Propyl, Isopropyl oder Hexyl.

Als C<sub>1-10</sub>-Alkenyl können beispielsweise Ethenyl, Propenyl, Allyl und Butenyl verwendet  
10 werden. Vorzugsweise wird Allyl verwendet.

Aryl bedeutet bevorzugt substituiertes oder unsubstituiertes Benzyl, Phenyl oder Naphtyl. Als substituiertes Benzyl kann beispielsweise halogeniertes Benzyl wie Chlor- oder Brombenzyl verwendet werden. Vorzugsweise wird unsubstituiertes Benzyl eingesetzt.

15 C<sub>3-8</sub>-Cycloalkyl bedeutet bevorzugt Cyclopropyl, Cyclobutyl, Cyclopentyl, Cyclohexyl, Cycloheptyl oder Cyclooctyl, vorzugsweise Cyclohexyl.

Alkoxyalkyl bedeutet bevorzugt C<sub>1-6</sub>-Alkoxyethyl wie Methoxyethyl und Ethoxyethyl,  
20 besonders bevorzugt Ethoxyethyl.

Alkoxyalkoxyalkyl bedeutet bevorzugt 2-(2-C<sub>1-6</sub>-Alkoxy-ethoxy)-ethyl wie 2-(2-Methoxy-ethoxy)-ethyl und 2-(2-Ethoxy-ethoxy)ethyl, wobei letzteres besonders bevorzugt eingesetzt wird.

25 Bevorzugte Edukte sind demnach Trifluoracetessigsäureethyl-, Trifluoracetessigsäurepropyl-, Trifluoracetessigsäureisopropyl- und Trifluoracetessigsäurehexylester, Trifluoracetessigsäurecyclohexylester, Trifluoracetessigsäurebenzylester, Trifluoracetessigsäureethoxyethylester, und Trifluoracetessigsäureethoxyethoxyethylester.

30 Zweckmäßige Mikroorganismen, die befähigt sind, eine Carbonylfunktion zu reduzieren, sind beispielsweise Mikroorganismen, die ein exprimierbares Gen für ein Enzym enthalten, das

befähigt ist eine Carbonylfunktion zu reduzieren, beispielsweise ein Enzym mit Reduktase-Aktivität, insbesondere ein Gen für eine Aldehydreduktase, eine Alkoholdehydrogenase oder eine Ketonreduktase. Die Enzyme, die befähigt sind, eine Carbonylfunktion zu reduzieren, können NADPH ( $\beta$ -Nikotinsäureamid-adeninucleotidphosphat)-abhängig oder von anderen  
5 Cofaktoren abhängig sein. Vorzugsweise kommen Mikroorganismen mit NADPH-abhängigen Reduktionssystemen zum Einsatz.

Zellfreie Enzymextrakte dieser Mikroorganismen können durch fachmännisch übliche Methoden, beispielsweise durch French-Press-, Ultraschall- oder Lysozym-Methode, erhalten  
10 werden.

Zweckmässig wird die Biotransformation mittels Mikroorganismen durchgeführt, die eine Aldehydreduktase, insbesondere eine NADPH-abhängige Aldehydreduktase, enthalten.

15 Mikroorganismen, die eine NADPH-abhängige Aldehydreduktase enthalten, wie Mikroorganismen der Spezies *Sporobolomyces salmonicolor*, sind bereits von Shimizu et al., 1990, *Applied and Environmental Microbiology*, 56(8), 2374 - 2377 und Kataoka, M. et al., *Biochimica et Biophysica Acta*, 1122, 57-62 (1992), beschrieben. Diese Mikroorganismen können zum einen selbst für das erfindungsgemässe Verfahren eingesetzt werden, zum anderen  
20 als Ausgangsmaterial für die Konstruktion von Plasmiden und weiteren geeigneten Mikroorganismen dienen.

Zweckmässig werden für die Biotransformation rekombinante Mikroorganismen eingesetzt, die mit einem Gen codierend für ein Enzym, das befähigt ist eine Carbonylfunktion zu reduzieren,  
25 transformiert sind. Mikroorganismen, die mit einem solchen Gen transformiert sein können, sind beispielsweise Mikroorganismen der Gattung *Escherichia*, insbesondere der Spezies *Escherichia coli*, beispielsweise *Escherichia coli* JM109, *Escherichia coli* DH5 und *Escherichia coli* HB101.

30 Bevorzugt befindet sich das Gen mit der Reduktase-Aktivität, beispielsweise eine Aldehydreduktase, auf einem zur Transformation geeigneten Vektor, beispielsweise einem Plasmid.

zweckmäßig zusammen mit einem zur Expression des Gens geeigneten Promotor wie dem tac-Promotor ( $P_{lac}$ ).

- 5 Sofern die verwendeten Mikroorganismen NADPH-abhängige Enzyme enthalten, wird die Biotransformation zweckmäßig in Gegenwart von NADPH durchgeführt. Das NADPH wird entweder direkt in den erforderlichen Mengen zugesetzt oder in situ hergestellt. Vorteilhaft wird das NADPH in situ hergestellt. Zu diesem Zweck wird die Biotransformation zweckmäßig in Gegenwart eines NADPH-Generators oder Regenerators durchgeführt, d.h. eines Enzyms, das die Bildung von NADPH aus dessen oxidierten Form,  $NADP^+$ , katalysiert.
- 10 Zweckmäßig wird als NADPH-Generator oder -Regenerator eine Glucosedehydrogenase eingesetzt, beispielsweise Glucosedehydrogenase aus *Bacillus megaterium*.

- Zur Generation von NADPH bei der Biotransformation wird diese zweckmäßig in Gegenwart eines Mikroorganismus durchgeführt, der den NADPH-Generator exprimiert. Insbesondere
- 15 werden hierzu rekombinante Mikroorganismen verwendet, die mit dem für den NADPH-Generator codierenden Gen transformiert sind. Das Gen für den NADPH-Generator befindet sich hierbei bevorzugt auf einem zur Transformation geeigneten Vektor, beispielsweise einem Plasmid, zweckmäßig zusammen mit einem zur Expression des Gens geeigneten Promotor wie dem tac-Promotor ( $P_{lac}$ ).

20

- Für die Herstellung der Trifluor-3(R)-hydroxybuttersäurederivate der allgemeinen Formel I mit einem ein zur Reduktion einer Carbonylfunktion befähigtes, NADPH-abhängiges Enzym, beispielsweise eine NADPH-abhängige Aldehyd-Reduktase, enthaltenden Mikroorganismus in Gegenwart eines NADPH-Generators können verschiedene Mikroorganismen eingesetzt
- 25 werden, von denen einer zur Reduktion der Carbonylfunktion und einer zur Bildung von NADPH befähigt ist. Vorteilhaft enthalten die erfindungsgemäß verwendeten, zur Reduktion einer Carbonylfunktion befähigten Mikroorganismen aber bereits selbst ein für einen NADPH-Generator oder -Regenerator codierendes Gen, beispielsweise ein Gen codierend für eine Glucosedehydrogenase.

30

Vorteilhaft werden für die Biotransformation rekombinante Mikroorganismen eingesetzt, die mit einem für ein NADPH-abhängiges Enzym, beispielsweise einem für eine NADPH-



abhängige Aldehydreduktase codierenden Gen, und einem für einen NADPH-Generator oder -Regenerator, beispielsweise einem für eine Glucosedehydrogenase codierenden Gen, transformiert sind. In einer möglichen Ausführungsform befinden sich diese Gene zur Expression auf einem einzigen Plasmid. In einer weiteren Ausführungsform liegen diese Gene auf verschiedenen, miteinander kompatiblen Plasmiden vor.

Die Biotransformation kann also vorteilhaft mittels Mikroorganismen durchgeführt werden, die enthalten:

- mindestens einen Vektor, beispielsweise ein Plasmid, der ein Gen für ein zur Reduktion einer Carbonylfunktion befähigtes Enzym, beispielsweise ein Aldehydreduktase-Gen, enthält;
- mindestens zwei Vektoren, beispielsweise Plasmide, von denen der eine ein Gen für ein zur Reduktion einer Carbonylfunktion befähigtes Enzym, beispielsweise ein Aldehydreduktase-Gen, und der andere ein Gen für einen NADPH-Generator oder -Regenerator, beispielsweise ein Glucosedehydrogenase-Gen; enthält, oder
- mindestens einen Vektor, beispielsweise ein Plasmid, der sowohl ein Gen für ein zur Reduktion einer Carbonylfunktion befähigtes Enzym, beispielsweise ein Aldehydreduktase-Gen, als auch ein Gen für einen NADPH-Generator oder -Regenerator, beispielsweise ein Glucosedehydrogenase-Gen; enthält.

Vorzugsweise wird die Biotransformation mittels Mikroorganismen der Spezies *E. coli* JM109 oder *E. coli* DH5, transformiert mit mindestens zwei Plasmiden enthaltend jeweils ein Aldehydreduktase- oder ein Glucosedehydrogenase-Gen, oder mittels Mikroorganismen der Spezies *E. coli* HB101 oder *E. coli* DH5, transformiert mit mindestens einem Plasmid, welches beide Gene, das Aldehydreduktase- und das Glucosedehydrogenase-Gen enthält, durchgeführt. Insbesondere wird die Biotransformation mit *E. coli* JM109 und *E. coli* DH5, enthaltend ein Aldehydreduktase- und ein Glucosedehydrogenase-Gen, durchgeführt. Selbstverständlich kann die Biotransformation auch mit verschiedenen Mikroorganismen, die jeweils nur eines der genannten Gene enthalten, durchgeführt werden.

Fig. 1 zeigt die Struktur eines für die vorliegende Erfindung geeigneten Plasmids, pKAR, das das Gen für die NADPH-abhängige Aldehyd-Reduktase aus *Sporobolomyces salmonicolor*

zusammen mit dem Promotor  $P_{lac}$  und einer Ampicillin (Ap)-Resistenz als Selektionsmarker enthält.

Fig. 2 zeigt die Struktur eines weiteren für die vorliegende Erfindung geeigneten Plasmids, pKKGDH, das das Gen für die Glucosedehydrogenase aus *Bacillus megaterium* zusammen mit dem Promotor  $P_{lac}$  und einer Kanamycin (Km)-Resistenz als Selektionsmarker enthält.

Der Mikroorganismus *E. coli* JM109, enthaltend das Plasmid pKAR mit einem Gen codierend für die NADPH-abhängige Aldehydreduktase aus *Sporobolomyces salmonicolor* und das Plasmid pKKGDH mit einem Gen codierend für die Glucosedehydrogenase aus *Bacillus megaterium*, wurde am 16.12.1997 bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), D-38124 Braunschweig, Mascheroderweg 1b, unter der Bezeichnung DSM 11902 gemäss Budapester Vertrag hinterlegt. Der Mikroorganismus *E. coli* DH5, enthaltend die Plasmide pKAR und pKKGDH, wurde am 7.12.1998 bei der zuvor beschriebenen Hinterlegungsstelle unter der Bezeichnung DSM 12566 gemäss Budapester Vertrag hinterlegt.

Die Expression der Gene kann abhängig vom Expressionssystem erfolgen. Bei den erfindungsgemäß bevorzugt verwendeten Expressionssystemen kann die Expression der Gene beispielsweise durch IPTG (Isopropylthiogalactosid) induziert werden, wenn als Mikroorganismus *E. coli* JM109 oder *E. coli* HB101 verwendet werden. Bei der Verwendung von *E. coli* DH5 ist die Induktion mit IPTG, wie fachmännisch bekannt, nicht notwendig.

Die Biotransformation kann nach üblichem Anzüchten der Zellen in einem einphasigen oder zweiphasigen System, vorzugsweise in einem zweiphasigen System, durchgeführt werden.

Als einphasiges System können fachmännisch übliche Puffer-Medien wie beispielsweise niedermolare Phosphatpuffer oder Tris-Puffer angewendet werden.

Als zweiphasiges System können die genannten fachmännisch üblichen Puffer-Medien zusammen mit einem für das Edukt löslichen organischen Lösungsmittel verwendet werden. Als organische Lösungsmittel sind beispielsweise Ester, Alkohole, halogenierte Kohlenwas-

serstoffe. Ether, aliphatische C<sub>5-12</sub>-Kohlenwasserstoffe oder aromatische Kohlenwasserstoffe geeignet. Als Ester können Essigsäureester wie Essigsäuremethyl-, Essigsäureethyl-, Essigsäurepropyl- und Essigsäurebutylester verwendet werden. Als Alkohole können C<sub>4-10</sub>-Alkohole wie Hexanol, Heptanol und Octanol verwendet werden. Als aromatische Kohlenwasserstoffe können beispielsweise Benzol, Toluol und Xylol verwendet werden. Als halogenierte Kohlenwasserstoffe können beispielsweise Chloroform und Dichlormethan verwendet werden. Als Ether können beispielsweise Diethylether, Tetrahydrofuran, Methyl-tert-butylether und Dibutylether verwendet werden. Als aliphatische C<sub>5-12</sub>-Kohlenwasserstoffe sind beispielsweise Pentan, Hexan, Heptan, Octan, Nonan und Decan geeignet.

10

Geeignet ist ebenfalls ein zweiphasiges System in welchem die zweite Phase aus dem Edukt und / oder aus dem Produkt besteht. Um die Löslichkeit des Eduktes zu erhöhen, können Cosolvenzien eingesetzt werden. Als Cosolvenzien können entweder niedermolekulare aliphatische Alkohole wie beispielsweise Methanol, Ethanol, Propanol, Isopropanol, tert-Butanol oder inerte Lösungsmittel wie beispielsweise Dimethylsulfoxid, Aceton, Acetonitril verwendet werden.

15

20

Üblicherweise wird die Biotransformation in Gegenwart einer C-Quelle durchgeführt. Als C-Quelle sind beispielsweise Kohlenhydrate wie Glucose, Fructose oder Saccharose und Zuckeralkohole wie Glycerin geeignet.

Der pH-Wert der Medien kann in einem Bereich von 5 bis 10, vorzugsweise von 6 bis 8, liegen.

25

Zweckmässig wird die Biotransformation bei einer Temperatur von 5 bis 60 °C, vorzugsweise von 10 bis 40 °C, durchgeführt.

Nach einer Umsetzungszeit von wenigen Minuten bis 50 h, kann dann das gewünschte Produkt in hoher Ausbeute und Enantiomerenreinheit (ee) isoliert werden.

30

**Beispiele****Beispiel 1****5 Anzucht der Mikroorganismen**

Zellen von *E. coli* JM109/pKAR,pKKGDH (DSMZ 11902) wurden in einem 20 l Fermenter in 12 l Mineralsalzmedium (Tabelle 1) bei 22 °C angezüchtet. Nach 6 h wurde IPTG hinzugegeben, um die Zellen zu induzieren. Dann wurde Glycerin hinzugegeben und die Zellen bis zu einer optischen Dichte  $OD_{650nm} = 41,8$  innerhalb 52 h angezüchtet. Dann wurden die

10 Zellen bei -80 °C aufbewahrt.

Tabelle 1

|  |          |
|--|----------|
| Hefeextrakt  | 0,5 g/l  |
| Glycerin   | 30 g/l   |
| MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O               | 0,8 g/l  |
| CaCl <sub>2</sub>                                    | 0,16 g/l |
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>      | 2,0 g/l  |
| SLF-Lösung   | 1,0 ml/l |
| Fe-EDTA-Lösung                                       | 1,5 ml/l |
| PPG-2000   | 0,1 g/l  |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O | 1,0 g/l  |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                      | 1,0 g/l  |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>                      | 1,0 g/l  |
| Thiamin  | 10 mg/l  |

**SLF-Lösung:**

|  |          |
|--|----------|
| KOH  | 15,1 g/l |
| EDTA Na <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O            | 100 g/l  |
| ZnSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O               | 9,0 g/l  |
| MnCl <sub>4</sub> x 4H <sub>2</sub> O                | 4,0 g/l  |
| H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>                       | 2,7 g/l  |
| CoCl <sub>3</sub> x 6H <sub>2</sub> O                | 1,8 g/l  |
| CuCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O                | 1,5 g/l  |
| NiCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O                | 0,18 g/l |
| Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O | 0,27 g/l |

**Fe-EDTA-Lösung:**

|   |        |
|---|--------|
| KOH                                     | 10 g/L |
| EDTANa <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O | 50 g/L |
| FeSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O   | 20 g/l |

**Beispiel 2****Herstellung von 4,4,4-Trifluor-3(R)-hydroxybuttersäureethylester**

- 5 a) Zu 800 ml Mineralsalzmedium (Tabelle 1) enthaltend *E. coli* JM109/ pKAR,pKKGDH bei einer  $OD_{650nm}$  von 7,2 wurden 140 g Glucose und 0,56 g  $NADP^+$  hinzugegeben. 400 ml Butylacetat enthaltend 70 g 4,4,4-Trifluoracetoacetatethylester wurde hinzugefügt und die resultierende Mischung in einen 2 l Fermenter gegeben, bei 400 Upm gerührt und mit Luft (400 ml/min.) begast. Der pH wurde durch Zugabe von 1 M  $Na_2CO_3$  auf 6,0 gehalten.
- 10 Nach 24 h enthielt die organische Phase 48 g 4,4,4-Trifluor-3(R)-hydroxybuttersäureethylester mit einem ee-Wert von >99%, entsprechend einer molaren Ausbeute von 67,8 %.
- b) Zu 800 ml Kaliumphosphatpuffer (100 mM, pH 6,0) enthaltend die Mikroorganismen
- 15 gemäss Beispiel 1 bei einer  $OD_{650nm}$  von 30,7 wurden 140 g Glucose und 0,56 g  $NADP^+$  hinzugefügt. 400 ml Butylacetat enthaltend 70 g 4,4,4-Trifluoracetoacetatethylester wurden hinzugegeben und die resultierende Mischung in einen Fermenter entsprechend Beispiel 2a eingespeist. Der pH wurde durch Zugabe von 1 M  $Na_2CO_3$  auf pH 6,0 gehalten. Nach 25 h wurden nochmals 10 g 4,4,4-Trifluoracetoacetatethylester hinzugefügt. Nach 45
- 20 h enthielt die organische Phase 49 g 4,4,4-Trifluor-3(R)-hydroxybuttersäureethylester mit einem ee-Wert von > 99 %, entsprechend einer molaren Ausbeute von 60,6 %.
- c) Zu 800 ml Kaliumphosphatpuffer (0,1 M, pH 6,0) enthaltend *E. coli* JM109/ pKAR,pKKGDH bei einer  $OD_{650}$  von 7,6 wurden 140 g Glucose und 50 mg  $NADP^+$
- 25 zugegeben. 400 ml Butylacetat enthaltend 70 g 4,4,4-Trifluoracetoacetatethylester wurden hinzugefügt und die resultierende Mischung in einen 2-l-Fermenter gegeben, mit 400 Upm gerührt und mit Luft (400 ml/min) begast. Der pH wurde durch Zugabe von 1M  $Na_2CO_3$  auf 6.0 gehalten. Weitere 50 mg  $NADP^+$  wurden 5 h nach Start des Fermenters zugegeben. Nach 24 h enthielt die organische Phase 50 g 4,4,4-Trifluor-3(R)-
- 30 hydroxybuttersäureethylester mit einem ee-Wert von >99,8%, entsprechend einer molaren Ausbeute von 71%.

- d) Zu 800 ml Kaliumphosphatpuffer (0,1 M, pH 6,0) enthaltend E. coli DH5/pKAR, pKKGDH bei einer  $OD_{630}$  von 6,5 wurden 140 g Glucose und 50mg  $NADP^+$  zugegeben. 400 ml Butylacetat enthaltend 70 g 4,4,4-Trifluoracetoacetatethylester wurden hinzugefügt und die resultierende Mischung in einen 2-l-Fermenter gegeben, mit 400 Upm gerührt und mit Luft (400 ml/min) begast. Der pH wurde durch Zugabe von 1M  $Na_2CO_3$  auf 6,0 gehalten. Weitere 50 mg  $NADP^+$  wurden jeweils nach 5 h und 26 h zugegeben. Nach 46 h enthielt die organische Phase 35 g 4,4,4-Trifluor-3(R)-hydroxybuttersäureethylester mit einem ee-Wert von 99,7%, entsprechend einer molaren Ausbeute von 51%.

### Beispiel 3

#### Herstellung von 4,4,4-Trifluor-3(R)-hydroxybuttersäureisopropylester

- a) Zu 800 ml Mineralsalzmedium entsprechend Beispiel 1 enthaltend E. coli JM109/pKAR, pKKGDH bei einer  $OD_{630nm}$  von 9,7 wurden 140 g Glucose und 0,56 g  $NADP^+$  hinzugefügt. 400 ml Butylacetat enthaltend 70 g 4,4,4-Trifluoressigsäureisopropylester wurden hinzugegeben und die resultierende Mischung in einem Fermenter entsprechend Beispiel 2 eingespeist. Der pH wurde durch Zugabe von 1 M  $Na_2CO_3$  auf pH 6,0 gehalten. Nach 21 h enthielt die organische Phase 42,2 g (R)-4,4,4-Trifluor-3-hydroxybuttersäureisopropylester mit einem ee-Wert von >99 %, entsprechend einer molaren Ausbeute von 59,7%.
- b) Zu 800 ml Kaliumphosphatpuffer (0,1 M, pH 6,0) enthaltend E. coli DH5/pKAR, pKKGDH bei einer  $OD_{630}$  von 8,5 wurden 140 g Glucose und 50mg  $NADP^+$  zugegeben. 400 ml Butylacetat enthaltend 70 g 4,4,4-Trifluoracetoacetatisopropylester wurden hinzugefügt und die resultierende Mischung in einen 2-l-Fermenter gegeben, mit 400 Upm gerührt und mit Luft (400 ml/min) begast. Der pH wurde durch Zugabe von 1M  $Na_2CO_3$  auf 6,0 gehalten. Weitere 50 mg  $NADP^+$  wurden 5 h nach Start des Fermenters zugegeben. Nach 24 h enthielt die organische Phase 32 g 4,4,4-Trifluor-3(R)-

hydroxybuttersäureisopropylester mit einem ee-Wert von >99,9%, entsprechend einer molaren Ausbeute von 46%.

## 5 Beispiel 4

### Herstellung von 4,4,4,-Trifluor-3(R)-hydroxybuttersäurehexylester

Zu 800 ml Kaliumphosphatpuffer (0,1 M, pH 6,0) enthaltend E. coli DH5/ pKAR,pKKGDH  
10 bei einer OD<sub>650</sub> von 9,5 wurden 140 g Glucose und 50 mg NADP<sup>+</sup> gegeben. 400 ml  
Butylacetat enthaltend 70 g 4,4,4-Trifluoracetoacetathexylester wurden hinzugefügt und die  
resultierende Mischung in einen 2-l-Fermenter gegeben, mit 400 Upm gerührt und mit Luft  
(400 ml/min) begast. Der pH wurde durch Zugabe von 1M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> auf 6,0 gehalten. Weitere  
50 mg NADP<sup>+</sup> wurden 5 h nach Start des Fermenters zugegeben. Nach 24 h enthielt die  
15 organische Phase 2 g 4,4,4-Trifluor-3(R)-hydroxybuttersäurehexylester mit einem ee-Wert von  
>99,9%, entsprechend einer molaren Ausbeute von 3%.

## Beispiel 5

20

### Herstellung von 4,4,4,-Trifluor-3(R)-hydroxybuttersäurecyclohexylester

Zu 800 ml Kaliumphosphatpuffer (0,1 M, pH 6,0) enthaltend E. coli DH5/pKAR,pKKGDH bei  
einer OD<sub>650</sub> von 8,9 wurden 140 g Glucose und 50 mg NADP<sup>+</sup> zugegeben. 400 ml Butylacetat  
25 enthaltend 70 g 4,4,4-Trifluoracetoacetatcyclohexylester wurden hinzugefügt und die  
resultierende Mischung in einen 2-l-Fermenter gegeben, mit 400 Upm gerührt und mit Luft  
(400 ml/min) begast. Der pH wurde durch Zugabe von 1M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> auf 6,0 gehalten. Weitere  
50 mg NADP<sup>+</sup> wurden 5 h nach Start des Fermenters zugegeben. Nach 24 h enthielt die  
organische Phase 16 g 4,4,4-Trifluor-3(R)-hydroxybuttersäurecyclohexylester mit einem ee-  
30 Wert von >99,9%, entsprechend einer molaren Ausbeute von 23%.



**Beispiel 6****Herstellung von 4,4,4,-Trifluor-3(R)-hydroxybuttersäurebenzylester**

- 5 Zu 800 ml Kaliumphosphatpuffer (0,1 M, pH 6,0) enthaltend E. coli DH5/pKAR,pKKGDH bei einer  $OD_{630}$  von 9,0 wurden 140 g Glucose und 50 mg  $NADP^+$  zugegeben. 400 ml Butylacetat enthaltend 70 g 4,4,4-Trifluoracetoacetatbenzylester wurden hinzugefügt und die resultierende Mischung in einen 2-l-Fermenter gegeben, mit 400 Upm gerührt und mit Luft (400 ml/min) begast. Der pH wurde durch Zugabe von 1M  $Na_2CO_3$  auf 6,0 gehalten. Weitere 50 mg  $NADP^+$
- 10 wurden 5 h nach Start des Fermenters zugegeben. Nach 24 h enthielt die organische Phase 6 g 4,4,4-Trifluor-3(R)-hydroxybuttersäurebenzylester mit einem ee-Wert von >99,9%, entsprechend einer molaren Ausbeute von 9%.

**15 Beispiel 7****Herstellung von 4,4,4,-Trifluor-3(R)-hydroxybuttersäure-2-ethoxyethylester**

- Zu 600 ml Kaliumphosphatpuffer (0,1 M, pH 6,0) enthaltend E. coli DH5/pKAR,pKKGDH bei
- 20 einer  $OD_{630}$  von 10,2 wurden 105 g Glucose und 37,5mg  $NADP^+$  zugegeben. 300 ml Butylacetat enthaltend 35 g 4,4,4-Trifluoracetoacetatethoxyethylester wurden hinzugefügt und die resultierende Mischung in einen 2-l-Fermenter gegeben, mit 400 Upm gerührt und mit Luft (300 ml/min) begast. Der pH wurde durch Zugabe von 1M  $Na_2CO_3$  auf 6,0 gehalten. Weitere 37,5 mg  $NADP^+$  wurden 5 h nach Start des Fermenters zugegeben. Nach 24 h enthielt die
- 25 organische Phase 4 g 4,4,4-Trifluor-3(R)-hydroxybuttersäureethoxyethylester mit einem ee-Wert von 98,6%, entsprechend einer molaren Ausbeute von 12%.

**Beispiel 8****Herstellung von 4,4,4-Trifluor-3(R)-hydroxybuttersäure-2-(2-ethoxyethoxy)ethylester**

- 5 Zu 600 ml Kaliumphosphatpuffer (0,1 M, pH 6,0) enthaltend E. coli DH5/pKAR,pKKGDH bei einer  $OD_{650}$  von 10,7 wurden 105 g Glucose und 37,5 mg  $NADP^+$  zugegeben. 300 ml Butylacetat enthaltend 35 g 4,4,4-Trifluoracetoacetatethoxyethoxyethylester wurden hinzugefügt und die resultierende Mischung in einen 2-l-Fermenter gegeben, mit 400 Upm gerührt und mit Luft (300 ml/min) begast. Der pH wurde durch Zugabe von 1M  $Na_2CO_3$  auf
- 10 6,0 gehalten. Weitere 37,5 mg  $NADP^+$  wurden 5 h nach Start des Fermenters zugegeben. Nach 24 h enthielt die organische Phase 5 g 4,4,4-Trifluor-3(R)-hydroxybuttersäureethoxyethoxyethylester mit einem ee-Wert von >99,9%, entsprechend einer molaren Ausbeute von 16%.

15

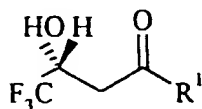
**Beispiel 9****Herstellung von 4,4,4-Trifluor-3(R)-hydroxybuttersäuremethylester**

- 20 Zu 600 ml Kaliumphosphatpuffer (0,1 M, pH 6,0) enthaltend E. coli DH5/pKAR,pKKGDH bei einer  $OD_{650}$  von 11,4 wurden 105 g Glucose und 37,5mg  $NADP^+$  zugegeben. 300 ml Butylacetat enthaltend 33 g 4,4,4-Trifluoracetoacetatmethylester wurden hinzugefügt und die resultierende Mischung in einen 2-l-Fermenter gegeben, mit 400 Upm gerührt und mit Luft (300 ml/min) begast. Der pH wurde durch Zugabe von 1M  $Na_2CO_3$  auf 6,0 gehalten. Weitere
- 25 37,5 mg  $NADP^+$  wurden 5 h nach Start des Fermenters zugegeben. Nach 24 h enthielt die organische Phase 3,6 g 4,4,4-Trifluor-3(R)-hydroxybuttersäuremethylester mit einem ee-Wert von 96,1%, entsprechend einer molaren Ausbeute von 7%.

## Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von Trifluor-3(R)-hydroxybuttersäurederivaten der allgemeinen Formel

5



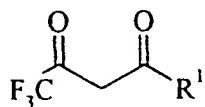
I

worin

$R^1$   $-OR^2$ , worin  $R^2$  Wasserstoff,  $C_{1-10}$ -Alkyl,  $C_{1-10}$ -Alkenyl,  $C_{3-8}$ -Cycloalkyl, Aryl, Alkoxyalkyl oder Alkoxyalkoxyalkyl ist,  
 $-NR^3R^4$ , worin  $R^3$  und  $R^4$  gleich oder verschieden sind und für Wasserstoff,  $C_{1-10}$ -Alkyl,  $C_{1-10}$ -Alkenyl,  $C_{3-8}$ -Cycloalkyl oder Aryl stehen, oder  
 $-SR^5$ , worin  $R^5$  Wasserstoff,  $C_{1-10}$ -Alkyl,  $C_{1-10}$ -Alkenyl, Aryl oder  $C_{3-8}$ -Cycloalkyl ist, bedeutet,

15

umfassend die Umsetzung eines Trifluoracetessigsäurederivats der allgemeinen Formel



II

20

worin  $R^1$  die genannte Bedeutung hat, mittels Mikroorganismen, die befähigt sind eine Carbonylfunktion zu reduzieren oder mittels einem zellfreien Enzymextrakt dieser Mikroorganismen.

25

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Biotransformation mittels Mikroorganismen der Gattung Escherichia durchgeführt wird, die mit einem Gen transformiert sind, das für ein Enzym codiert, welches befähigt ist, eine Carbonylfunktion zu reduzieren.

3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Biotransformation mittels Mikroorganismen der Spezies *Escherichia coli* JM109, *Escherichia coli* HB 101 oder *Escherichia coli* DH5 durchgeführt wird, die mit einem Gen transformiert sind, das für ein Enzym codiert, welches befähigt ist, eine Carbonylfunktion zu reduzieren.

5

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Biotransformation mittels Mikroorganismen der Spezies *Escherichia coli* JM109, *Escherichia coli* HB101 oder *Escherichia coli* DH5 durchgeführt wird, die mit Genen transformiert sind, die sowohl für ein Enzym, welches befähigt ist, eine Carbonylfunktion zu reduzieren, als auch für eine Glucosedehydrogenase codieren.

10

5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Biotransformation mittels Mikroorganismen der Spezies *Escherichia coli* JM109 oder der Spezies *Escherichia coli* DH5 durchgeführt wird, die mit den Plasmiden pKAR und pKKGDH transformiert sind, wie hinterlegt unter der Hinterlegungsnummer DSM 11902 bzw. DSM 12566.

15

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass die Biotransformation bei einer Temperatur von 5 bis 60°C durchgeführt wird.

- 20 7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass die Biotransformation bei einem pH von 5 bis 10 durchgeführt wird.

1/1

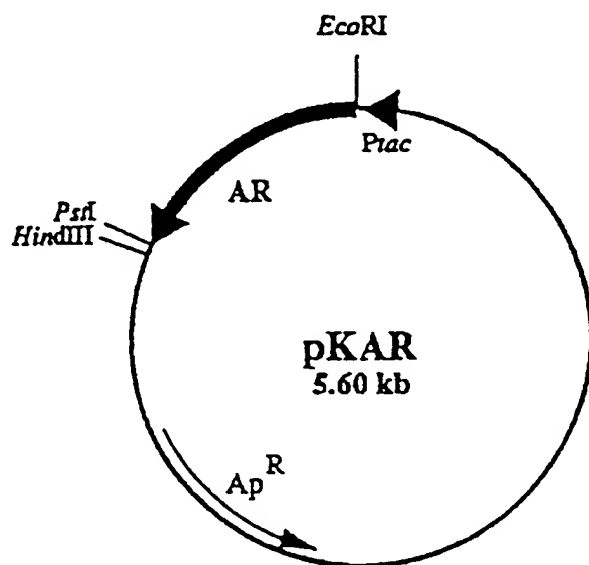


Fig. 1

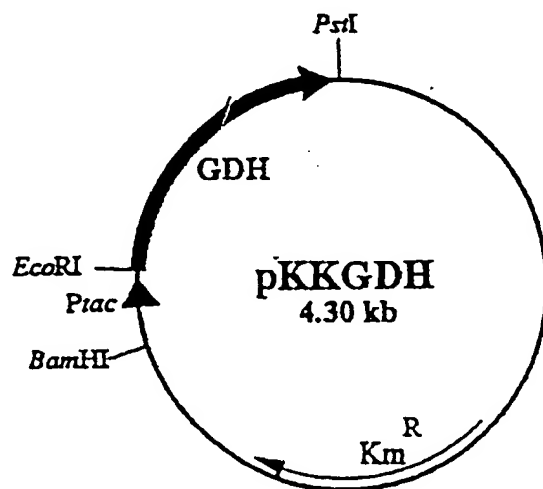


Fig. 2

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 99/01017

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N15/53 C12P7/42 C12P7/62 C12P11/00 C12P13/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12P C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages   | Relevant to claim No. |
|------------|--|-----------------------|
| X          | WO 93 18138 A (KERNFORSCHUNGSANLAGE JUELICH) 16 September 1993<br>see page 10 - page 16; claim 5; example 3; table 4   | 1,6,7                 |
| Y          | see claim 5; example 3; table 4<br>---   | 2,3                   |
| Y          | KITA: "cloning of the aldehyde reductase gene from a red yeast, <i>Sporobolomyces salmonicolor</i> , and characterization of the gene and its product"<br>APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, vol. 62, no. 7, July 1996, pages 2303-2310, XP002105940<br>see page 2308 - page 2309; figures 2,3,7<br>---<br>-/-- | 2,3                   |

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

16 June 1999

Date of mailing of the international search report

29/06/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

van Klompenburg, W

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

I. International Application No

PCT/EP 99/01017

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No. |
|------------|---|-----------------------|
| X          | <p>EHRLER ET AL: "Notiz über<br/>microbiologische Umsetzungen mit<br/>Halobacterium halobium: Reduktion von<br/>3-Oxobutansäure-ethylester und Hydrolyse<br/>von 3-Hydroxybutansäure-ethylester.<br/>Cooperative Effekte von Reduktase und<br/>Hydrolase"<br/>HELVETICA CHIMICA ACTA,<br/>vol. 72, 1989, pages 793--799, XP002008201<br/>see page 796 - page 798; table 2</p> | 1,6                   |
| A          | <p>EP 0 645 453 A (DAICEL CHEM) 29 March 1995<br/>see page 7, line 31 - line 51; examples<br/>16-19</p>   | 2-4                   |

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

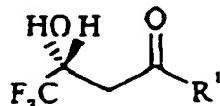
International Application No

PCT/EP 99/01017

| Patent document<br>cited in search report | Publication<br>date | Patent family<br>member(s) | Publication<br>date |
|---|---------------------|----------------------------|---------------------|
| WO 9318138 A                              | 16-09-1993          | CA 2117482 A               | 16-09-1993          |
|   |                     | DE 59306681 D              | 10-07-1997          |
|   |                     | DK 630402 T                | 22-12-1997          |
|   |                     | EP 0630402 A               | 28-12-1994          |
|   |                     | JP 7505770 T               | 29-06-1995          |
|   |                     | US 5523223 A               | 04-06-1996          |
| EP 0645453 A                              | 29-03-1995          | JP 7231785 A               | 05-09-1995          |
|   |                     | US 5763236 A               | 09-06-1998          |



1. Process for preparing trifluoro-3(R)-hydroxybutyric acid derivatives of the general formula



5 in which

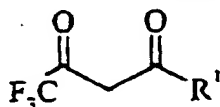
R<sup>1</sup> is -OR<sup>2</sup>, in which R<sup>2</sup> is hydrogen, C<sub>1-10</sub>-alkyl, C<sub>1-10</sub>-alkenyl, C<sub>3-8</sub>-cycloalkyl, aryl, alkoxyalkyl or alkoxyalkoxyalkyl,

10 -NR<sup>3</sup>R<sup>4</sup>, in which R<sup>3</sup> and R<sup>4</sup> are identical or different and represent hydrogen, C<sub>1-10</sub>-alkyl, C<sub>1-10</sub>-alkenyl, C<sub>3-8</sub>-cycloalkyl or aryl, or

-SR<sup>5</sup>, in which R<sup>5</sup> is hydrogen, C<sub>1-10</sub>-alkyl, C<sub>1-10</sub>-alkenyl, aryl or C<sub>3-8</sub>-cycloalkyl,

15

which process comprises reacting a trifluoroacetoacetic acid derivative of the general formula



20 in which R<sup>1</sup> has the said meaning, using microorganisms which are capable of reducing a carbonyl function or using a cell-free enzyme extract of these microorganisms.

2. Process according to Claim 1, characterized in that the biotransformation is carried out using 25 microorganisms of the genus Escherichia which are transformed with a gene which encodes an enzyme which is capable of reducing a carbonyl function.

3. Process according to Claim 2, characterized in that the biotransformation is carried out using 30 microorganisms of the species Escherichia coli JM109, Escherichia coli HB 101 or Escherichia coli DH5 which are transformed with a gene which encodes an enzyme which is capable of reducing a carbonyl function.

4. Process according to one of Claims 1 to 3, 35 characterized in that the biotransformation is carried

out using microorganisms of the species *Escherichia coli* JM109, *Escherichia coli* HB101 or *Escherichia coli* DH5 which are transformed with genes which encode both an enzyme which is capable of reducing a carbonyl  
5 function and a glucose dehydrogenase.

5. Process according to Claim 4, characterized in that the biotransformation is carried out using microorganisms of the species *Escherichia coli* JM109 or the species *Escherichia coli* DH5 which are transformed  
10 with the plasmids pKAR and pKGDH, as deposited under the deposition numbers DSM 11902 and DSM 12566, respectively.

6. Process according to one of Claims 1 to 5, characterized in that the biotransformation is carried  
15 out at a temperature of from 5 to 60°C.

7. Process according to one of Claims 1 to 6, characterized in that the biotransformation is carried out at a pH of from 5 to 10.

1/1

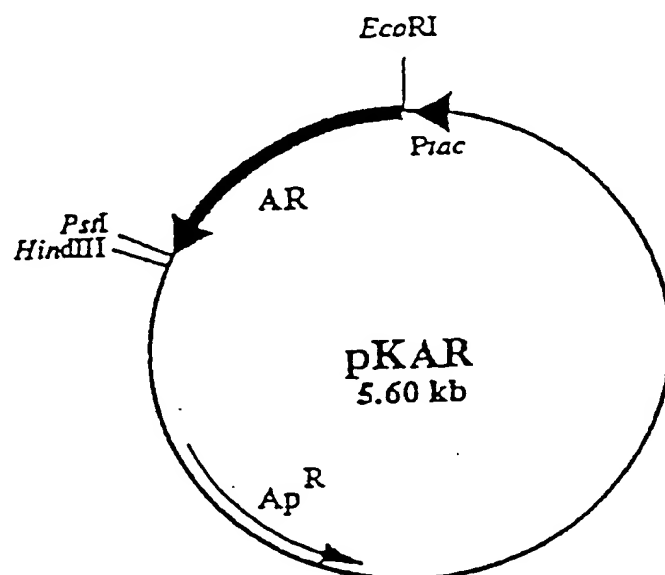


Fig. 1

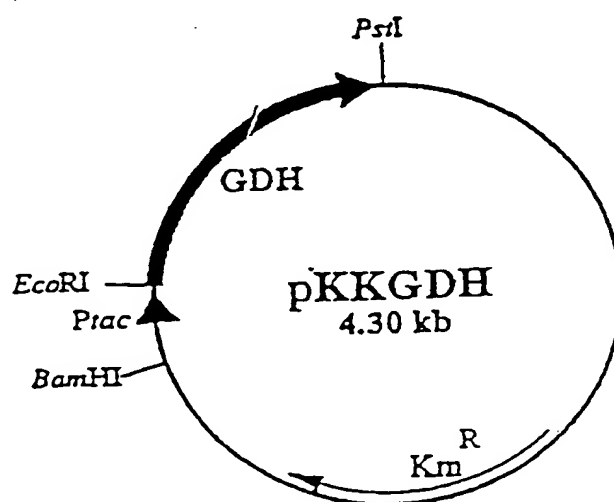
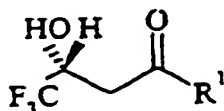


Fig. 2

Process for preparing trifluoro-3(R)-hydroxybutyric  
acid derivatives

The invention relates to a novel bio-  
technological process for preparing trifluoro-3(R)-  
5 hydroxybutyric acid derivatives of the general formula



I

Trifluoro-3(R)-hydroxybutyric acid derivatives such as  
ethyl 4,4,4-trifluoro-3(R)-hydroxybutyrate are  
important intermediates for preparing pharmaceuticals,  
10 for example for preparing Befloxatone, a monoamine  
oxidase A inhibitor (EP-A-0 736 606).

Several biotechnological processes for  
preparing 4,4,4-trifluoro-3(R)-hydroxybutyric esters  
have already been disclosed.  
15 Guerrero, A. & Raja, E. (Bioorganic Chemistry Letters  
1(12), 675-678) describe a microbiological process for  
preparing ethyl 4,4,4-trifluoro-3(R)-hydroxybutyrate  
using *Saccharomyces cerevisiae* and proceeding from the  
corresponding racemate. In this method, the  
20 enantiomeric purity of the resulting desired product is  
poor.

EP-A-0 736 606 describes a biotechnological process for  
preparing ethyl 4,4,4-trifluoro-3(R)-hydroxybutyrate  
which uses the lipase Novozym 435 and which proceeds  
25 from ethyl 4,4,4-trifluoro-3-hydroxybutyrate. The  
disadvantage of this process is the indifferent yield  
of the desired product.

EP-A-0 577 446 includes a biotechnological  
process for preparing optically active ethyl 4,4,4-  
30 trifluoro-3-hydroxybutyrate which uses lipases and  
proceeds from the corresponding racemic ester. When  
this process is used, the product is obtained in low  
yield and its optical purity is poor.

WO 89/02 470 describes a process for preparing  
35 ethyl 4,4,4-trifluoro-3(R)-hydroxybutyrate which uses  
hydrolytic enzymes and which proceeds from racemic

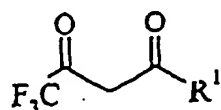
009077-5822260

ethyl 4,4,4-trifluoro-3-acyloxybutyrate. However, this process does not yield the corresponding product in enantiomerically pure form.

The object of the present invention was to make available a biotechnological process for preparing 4,4,4-trifluoro-3(R)-hydroxybutyric acid derivatives which enables the desired product to be isolated in good yield and at a good level of optical purity.

This object is achieved using the process according to Claim 1.

According to the invention, the process is carried out by a trifluoroacetoacetic acid derivative of the general formula



II

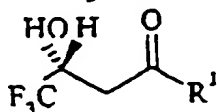
in which

$\text{R}^1$  is  $-\text{OR}^2$ , in which  $\text{R}^2$  is hydrogen,  $\text{C}_{1-10}$ -alkyl,  $\text{C}_{1-10}$ -alkenyl,  $\text{C}_{3-8}$ -cycloalkyl, aryl, alkoxyalkyl or alkoxyalkoxyalkyl,

$-\text{NR}^3\text{R}^4$ , in which  $\text{R}^3$  and  $\text{R}^4$  are identical or different and represent hydrogen,  $\text{C}_{1-10}$ -alkyl,  $\text{C}_{1-10}$ -alkenyl,  $\text{C}_{3-8}$ -cycloalkyl or aryl, or

$-\text{SR}^5$ , in which  $\text{R}^5$  is hydrogen,  $\text{C}_{1-10}$ -alkyl,  $\text{C}_{1-10}$ -alkenyl, aryl or  $\text{C}_{3-8}$ -cycloalkyl,

being converted by means of microorganisms which are able to reduce a carbonyl function, or by means of a cell-free enzyme extract of these microorganisms, into the compound of the general formula



I

in which  $\text{R}^1$  has the said meaning.

In that which follows, a branched or unbranched, primary, secondary or tertiary aliphatic group, such as methyl, ethyl, propyl, isopropyl, butyl, isobutyl, sec-butyl, tert-butyl, pentyl, isopentyl, sec-pentyl, hexyl, heptyl, octyl, nonyl or decyl can be

005011 5822250

used as C<sub>1-10</sub>-alkyl. C<sub>1-10</sub>-alkyl preferably denotes ethyl, propyl, isopropyl or hexyl.

Ethenyl, propenyl, allyl and butenyl can, for example, be used as C<sub>1-10</sub>-alkenyl. Allyl is preferably used.

Aryl preferably denotes substituted or unsubstituted benzyl, phenyl or naphthyl. Halogenated benzyl, such as chloro- or bromobenzyl, can, for example, be used as substituted benzyl. Unsubstituted benzyl is preferably employed.

C<sub>3-8</sub>-cycloalkyl preferably denotes cyclopropyl, cyclobutyl, cyclopentyl, cyclohexyl, cycloheptyl or cyclooctyl, preferably cyclohexyl.

Alkoxyalkyl preferably denotes C<sub>1-6</sub>-alkoxyethyl such as methoxyethyl and ethoxyethyl, particularly preferably ethoxyethyl.

Alkoxyalkoxyalkyl preferably denotes 2-(2-C<sub>1-6</sub>-alkoxy-ethoxy)ethyl, such as 2-(2-methoxyethoxy)ethyl and 2-(2-ethoxyethoxy)ethyl, with the latter being particularly preferably employed.

Consequently, preferred starting compounds are ethyl trifluoroacetoacetate, propyl trifluoroacetoacetate, isopropyl trifluoroacetoacetate and hexyl trifluoroacetoacetate, cyclohexyl trifluoroacetoacetate, benzyl trifluoroacetoacetate, ethoxyethyl trifluoroacetoacetate and ethoxyethoxyethyl trifluoroacetoacetate.

Examples of expedient microorganisms which are able to reduce a carbonyl function are microorganisms which contain an expressable gene for an enzyme which is able to reduce a carbonyl function, for example an enzyme possessing reductase activity, in particular a gene for an aldehyde reductase, an alcohol dehydrogenase or a ketone reductase. The enzymes which are able to reduce a carbonyl function can be NADPH ( $\beta$ -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate)-dependent or be dependent on other cofactors. Preference is given to using microorganisms which contain NADPH-dependent reduction systems.

00523385 110500

Cell-free enzyme extracts of these microorganisms can be obtained by means of methods which are customary to the skilled person, for example by means of the French press method, the ultrasonication method or the lysozyme method.

The biotransformation is expediently carried out using microorganisms which contain an aldehyde reductase, in particular an NADPH-dependent aldehyde reductase.

Microorganisms which contain an NADPH-dependent aldehyde reductase, such as microorganisms of the species *Sporobolomyces salmonicolor*, have already been described by Shimizu et al., 1990, Applied and Environmental Microbiology, 56(8), 2374-2377 and Kataoka, M. et al., Biochimica et Biophysica Acta, 1112, 57-62 (1992). These microorganisms can, on the one hand, be used themselves for the process according to the invention and, on the other hand, serve as the starting material for constructing plasmids and other suitable microorganisms.

Recombinant microorganisms which are transformed with a gene encoding an enzyme which is able to reduce a carbonyl function are expediently employed for the biotransformation. Examples of microorganisms which can be transformed with such a gene are microorganisms of the genus *Escherichia*, in particular the species *Escherichia coli*, for example *Escherichia coli* JM109, *Escherichia coli* DH5 and *Escherichia coli* HB101.

The gene possessing the reductase activity, for example an aldehyde reductase, is preferably located on a vector which is suitable for the transformation, for example a plasmid, expediently together with a promoter which is suitable for expressing the gene, such as the tac promoter ( $P_{tac}$ ).

Provided the microorganisms employed contain NADPH-dependent enzymes, the biotransformation is expediently carried out in the presence of NADPH. The NADPH is either added directly in the requisite

00907: 5822960

quantities or produced in situ. Advantageously, the NADPH is produced in situ. For this purpose, the biotransformation is expediently carried out in the presence of an NADPH generator or regenerator, i.e. an enzyme which catalyzes the formation of NADPH from its oxidized form, i.e.  $\text{NADP}^+$ . A glucose dehydrogenase, for example *Bacillus megaterium* glucose dehydrogenase, is expediently employed as the NADPH generator or regenerator.

In order to generate NADPH during the biotransformation, the latter is expediently carried out in the presence of a microorganism which expresses the NADPH generator. Recombinant microorganisms which are transformed with the gene encoding the NADPH generator are, in particular, used for this purpose. In this case, the gene for the NADPH generator is located on a vector which is suitable for the transformation, for example a plasmid, expediently together with a promoter which is suitable for expressing the gene, such as the  $\text{tac}$  promoter ( $\text{P}_{\text{tac}}$ ).

Different microorganisms, one of which is able to reduce the carbonyl function and one of which is able to form NADPH, can be employed for preparing the trifluoro-3(R)-hydroxybutyric acid derivatives of the general formula I using, in the presence of an NADPH generator, a microorganism which contains an NADPH-dependent enzyme which is capable of reducing a carbonyl function, for example an NADPH-dependent aldehyde reductase. However, the microorganisms which are used in accordance with the invention, and which are able to reduce a carbonyl function, advantageously already themselves contain a gene which encodes an NADPH generator or regenerator, for example a gene which encodes a glucose dehydrogenase.

Recombinant microorganisms which are transformed with a gene which encodes an NADPH-dependent enzyme, for example a gene which encodes an NADPH-dependent aldehyde reductase, and also a gene which encodes an NADPH generator or regenerator, for

00622385-10600



example a gene which encodes a glucose dehydrogenase, are advantageously employed for the biotransformation. In one possible embodiment, these genes are located for expression on one single plasmid. In another  
5 embodiment, these genes are present on different, mutually compatible plasmids.

Consequently, the biotransformation can advantageously be carried out using microorganisms which contain:

- 10 • at least one vector, for example a plasmid, which contains a gene for an enzyme which is capable of reducing a carbonyl function, for example an aldehyde reductase gene;
- 15 • at least two vectors, for example plasmids, one of which contains a gene for an enzyme capable of reducing a carbonyl function, for example an aldehyde reductase gene, while the other contains a gene for an NADPH generator or regenerator, for example a glucose dehydrogenase gene; or
- 20 • at least one vector, for example a plasmid, which contains both a gene for an enzyme which is capable of reducing a carbonyl function, for example an aldehyde reductase gene, and also a gene for an NADPH generator or regenerator, for example a glucose  
25 dehydrogenase gene.

Advantageously, the biotransformation is carried out using microorganisms of the species E. coli JM109 or E. coli DH5 which are transformed with at least two plasmids which respectively contain an  
30 aldehyde reductase gene and a glucose dehydrogenase gene, or using microorganisms of the species E. coli HB101 or E. coli DH5 which are transformed with at least one plasmid which contains both genes, i.e. the aldehyde reductase gene and the glucose dehydrogenase  
35 gene. In particular, the biotransformation is carried out using E. coli JM109 and E. coli DH5 which contain an aldehyde reductase gene and a glucose dehydrogenase gene. Naturally, the biotransformation can also be

carried out using different microorganisms which in each case contain only one of the said genes.

Fig. 1 shows the structure of a plasmid, pKAR, which is suitable for the present invention and which contains the gene for the *Sporobolomyces salmonicolor* NADPH-dependent aldehyde reductase together with the  $P_{tac}$  promoter and an ampicillin (Ap) resistance as the selection marker.

Fig. 2 shows the structure of another plasmid, pKKGDH, which is suitable for the present invention and which contains the gene for the *Bacillus megaterium* glucose dehydrogenase together with the  $P_{tac}$  promoter and a kanamycin (Km) resistance as the selection marker.

The microorganism *E. coli* JM109, harbouring the plasmid pKAR, containing a gene encoding the *Sporobolomyces salmonicolor* NADPH-dependent aldehyde reductase, and the plasmid pKKGDH, containing a gene encoding the *Bacillus megaterium* glucose dehydrogenase, was deposited in the Deutsche Sammlung von Mikroorganismen and Zellkulturen [German Collection of Microorganisms and Cell Cultures] GmbH (DSMZ), D-38124 Braunschweig, Mascheroderweg 1b, Germany, under designation DSM 11902, in accordance with the Budapest Treaty, on 16.12.1997. The microorganism *E. coli* DH5, harbouring the plasmids pKAR and pKKGDH, was deposited in the abovementioned depository institution under designation DSM 12566, in accordance with the Budapest Treaty, on 7.12.1998.

The genes can be expressed in dependence on the expression system. In the case of the expression systems which are preferably used in accordance with the invention, the expression of the genes can, for example, be induced with IPTG (isopropylthio-galactoside) if *E. coli* JM109 or *E. coli* HB101 is used as the microorganism. As the skilled person knows, induction with IPTG is not necessary when *E. coli* DH5 is used.

00523235-140500

Following customary culture of the cells, the biotransformation can be carried out in a single-phase or two-phase system, preferably in a two-phase system.

5 Buffer media which are customary to the skilled person, such as low molecular weight phosphate buffers or Tris buffers, can be employed as a single-phase system.

10 The said buffer media which are customary to the skilled person, together with an organic solvent in which the starting compound is soluble, can be used as a two-phase system. Examples of suitable organic solvents are esters, alcohols, halogenated hydrocarbons, ethers, aliphatic C<sub>5-12</sub>-hydrocarbons or aromatic hydrocarbons. Acetic esters, such as methyl  
15 acetate, ethyl acetate, propyl acetate and butyl acetate, can be used as esters. C<sub>4-10</sub>-alcohols, such as hexanol, heptanol and octanol, can be used as alcohols. Benzene, toluene and xylene can, for example, be used as aromatic hydrocarbons. Chloroform and dichloromethane  
20 can, for example, be used as halogenated hydrocarbons. Diethyl ether, tetrahydrofuran, methyl tert-butyl ether and dibutyl ether can, for example, be used as ethers. Examples of suitable aliphatic C<sub>5-12</sub>-hydrocarbons are pentane, hexane, heptane, octane, nonane and decane.

25 A two-phase system in which the second phase consists of the starting compound and/or product is also suitable. Cosolvents can be employed for increasing the solubility of the starting compound. Either low molecular weight aliphatic alcohols, such as  
30 methanol, ethanol, propanol, isopropanol or tert-butanol, or inert solvents, such as dimethyl sulphoxide, acetone and acetonitrile, can be used as cosolvents.

35 The biotransformation is customarily carried out in the presence of a C source. Examples of suitable C sources are carbohydrates such as glucose, fructose or sucrose, and sugar alcohols, such as glycerol.

The pH of the media can be in a range of from 5 to 10, preferably of from 6 to 8.

00907 9822950

After a reaction time of from a few minutes to 50 h, the desired product can then be isolated in high yield and at high enantiomeric purity (ee).

Examples

Example 1

5    **Culturing the microorganisms**

          E. coli JM109/pKAR,pKGDH (DSMZ 11902) cells  
were cultured at 22°C in 12 l of mineral salt medium  
(Table 1) in a 20 l fermenter. After 6 h, IPTG was  
added in order to induce the cells. Glycerol was then  
10 added and the cells were cultured, within 52 h, up to  
an optical density of  $OD_{650nm} = 41.8$ . The cells were then  
stored at -80°C.

00622225-110600

Table 1

|    |  |      |      |
|----|--|------|------|
|    | Yeast extract  | 0.5  | g/l  |
|    | Glycerol   | 30   | g/l  |
| 5  | MgCl <sub>2</sub> × 6H <sub>2</sub> O                | 0.8  | g/l  |
|    | CaCl <sub>2</sub>                                    | 0.16 | g/l  |
|    | (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>      | 2.0  | g/l  |
|    | SLF solution   | 1.0  | ml/l |
|    | Fe-EDTA solution                                     | 1.5  | ml/l |
| 10 | PPG-2000   | 0.1  | g/l  |
|    | Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> × 2H <sub>2</sub> O | 1.0  | g/l  |
|    | KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                      | 1.0  | g/l  |
|    | K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>                      | 1.0  | g/l  |
|    | Thiamine   | 10   | mg/l |
| 15 | <b>SLF solution:</b>                                 |      |      |
|    | KOH  | 15.1 | g/l  |
|    | 2H <sub>2</sub> O                                    | 100  | g/l  |
|    |  | 0    | g/l  |
| 20 | MnCl <sub>2</sub>                                    |      |      |
|    | H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>                       | 2.7  | g/l  |
|    | CoCl <sub>3</sub> × 6H <sub>2</sub> O                | 1.8  | g/l  |
|    | CuCl <sub>2</sub> × 2H <sub>2</sub> O                | 1.5  | g/l  |
|    | NiCl <sub>2</sub> × 6H <sub>2</sub> O                | 0.18 | g/l  |
| 25 | Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> × 2H <sub>2</sub> O | 0.27 | g/l  |
|    | <b>Fe-EDTA solution:</b>                             |      |      |
|    | KOH  | 10   | g/l  |
|    | EDTANa <sub>2</sub> × 2H <sub>2</sub> O              | 50   | g/l  |
| 30 | FeSO <sub>4</sub> × 7H <sub>2</sub> O                | 20   | g/l  |

0062335-110500

## Example 2

### Preparation of ethyl 4,4,4-trifluoro-3(R)-hydroxybutyrate

- 5 a) 140 g of glucose and 0.56 g of  $\text{NADP}^+$  were added to 800 ml of mineral salt medium (Table 1) containing *E. coli* JM109/pKAR,pKKGDH at an  $\text{OD}_{650\text{nm}}$  of 7.2. 400 ml of butyl acetate containing 70 g of ethyl 4,4,4-trifluoroacetoacetate were added and the resulting
- 10 mixture was placed in a 2 l fermenter, stirred at 400 rpm and gassed with air (400 ml/min). The pH was kept at 6.0 by adding 1 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . After 24 h, the organic phase contained 48 g of ethyl 4,4,4-trifluoro-3(R)-hydroxybutyrate having an ee value of >99%,
- 15 corresponding to a molar yield of 67.8%.
- b) 140 g of glucose and 0.56 g of  $\text{NADP}^+$  were added to 800 ml of potassium phosphate buffer (100 mM, pH 6.0) containing the microorganisms according to
- 20 Example 1 at an  $\text{OD}_{650\text{nm}}$  of 30.7. 400 ml of butyl acetate containing 70 g of ethyl 4,4,4-trifluoroacetoacetate were added and the resulting mixture was fed into a fermenter as described in Example 2a. The pH was kept at pH 6.0 by adding 1 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . After 25 h, a further
- 25 10 g of ethyl 4,4,4-trifluoroacetoacetate were added. After 45 h, the organic phase contained 49 g of ethyl 4,4,4-trifluoro-3(R)-hydroxybutyrate having an ee value of >99%, corresponding to a molar yield of 60.6%.
- c) 140 g of glucose and 50 mg of  $\text{NADP}^+$  were added to 800 ml of potassium phosphate buffer (0.1 M, pH 6.0)
- 30 containing *E. coli* JM109/pKAR,pKKGDH at an  $\text{OD}_{650\text{nm}}$  of 7.6. 400 ml of butyl acetate containing 70 g of ethyl 4,4,4-trifluoroacetoacetate were added and the resulting mixture was placed in a 2 l fermenter, stirred at 400 rpm and gassed with air (400 ml/min).
- 35 The pH was kept at 6.0 by adding 1 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . A further 50 mg of  $\text{NADP}^+$  were added 5 h after starting the fermenter. After 24 h, the organic phase contained 50 g of ethyl 4,4,4-trifluoro-3(R)-hydroxybutyrate having an

009011 5822960

ee value of >99.8%, corresponding to a molar yield of 71%.

d) 140 g of glucose and 50 mg of NADP<sup>+</sup> were added to 800 ml of potassium phosphate buffer (0.1 M, pH 6.0) containing E. coli DH5/pKAR,pKKGDH at an OD<sub>650nm</sub> of 6.5. 400 ml of butyl acetate containing 70 g of ethyl 4,4,4-trifluoroacetoacetate were added and the resulting mixture was placed in a 2 l fermenter, stirred at 400 rpm and gassed with air (400 ml/min). The pH was kept at 6.0 by adding 1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. A further 50 mg of NADP<sup>+</sup> were in each case added after 5 h and after 26 h. After 46 h, the organic phase contained 35 g of ethyl 4,4,4-trifluoro-3(R)-hydroxybutyrate having an ee value of >99.7%, corresponding to a molar yield of 51%.

### Example 3

#### Preparation of isopropyl 4,4,4-trifluoro-3(R)-hydroxybutyrate

a) 140 g of glucose and 0.56 g of NADP<sup>+</sup> were added to 800 ml of mineral salt medium in accordance with Example 1 containing E. coli JM109/pKAR,pKKGDH at an OD<sub>650nm</sub> of 9.7. 400 ml of butyl acetate containing 70 g of isopropyl 4,4,4-trifluoroacetoacetate were added and the resulting mixture was fed into fermenter as described in Example 2. The pH was kept at pH 6.0 by adding 1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. After 21 h, the organic phase contained 42.2 g of isopropyl 4,4,4-trifluoro-3(R)-hydroxybutyrate having an ee value of >99%, corresponding to a molar yield of 59.7%.

b) 140 g of glucose and 50 mg of NADP<sup>+</sup> were added to 800 ml of potassium phosphate buffer (0.1 M, pH 6.0) containing E. coli DH5/pKAR,pKKGDH at an OD<sub>650nm</sub> of 8.5. 400 ml of butyl acetate containing 70 g of isopropyl 4,4,4-trifluoroacetoacetate were added and the resulting mixture was placed in a 2 l fermenter, stirred at 400 rpm and gassed with air (400 ml/min). The pH was kept at 6.0 by adding 1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. A further 50 mg of NADP<sup>+</sup> were added 5 h after starting the

00522385 110600



fermenter. After 24 h, the organic phase contained 32 g of isopropyl 4,4,4-trifluoro-3(R)-hydroxybutyrate having an ee value of >99.9%, corresponding to a molar yield of 46%.

5

#### Example 4

##### Preparation of hexyl 4,4,4-trifluoro-3(R)-hydroxybutyrate

10 140 g of glucose and 50 mg of NADP<sup>+</sup> were added to 800 ml of potassium phosphate buffer (0.1 M, pH 6.0) containing E. coli DH5/pKAR,pKKGDH at an OD<sub>650nm</sub> of 9.5. 400 ml of butyl acetate containing 70 g of hexyl 4,4,4-trifluoroacetoacetate were added and the resulting  
15 mixture was placed in a 2 l fermenter, stirred at 400 rpm and gassed with air (400 ml/min). The pH was kept at pH 6.0 by adding 1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. A further 50 mg of NADP<sup>+</sup> were added 5 h after starting the fermenter. After 24 h, the organic phase contained 2 g of hexyl  
20 4,4,4-trifluoro-3(R)-hydroxybutyrate having an ee value of >99.9%, corresponding to a molar yield of 3%.

#### Example 5

##### Preparation of cyclohexyl 4,4,4-trifluoro-3(R)-hydroxybutyrate

25 140 g of glucose and 50 mg of NADP<sup>+</sup> were added to 800 ml of potassium phosphate buffer (0.1 M, pH 6.0) containing E. coli DH5/pKAR,pKKGDH at an OD<sub>650nm</sub> of 8.9. 400 ml of butyl acetate containing 70 g of cyclohexyl  
30 4,4,4-trifluoroacetoacetate were added and the resulting mixture was placed in a 2 l fermenter, stirred at 400 rpm and gassed with air (400 ml/min). The pH was kept at pH 6.0 by adding 1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. A  
35 further 50 mg of NADP<sup>+</sup> were added 5 h after starting the fermenter. After 24 h, the organic phase contained 16 g of cyclohexyl 4,4,4-trifluoro-3(R)-hydroxybutyrate having an ee value of >99.9%, corresponding to a molar yield of 23%.

00507-582950

### Example 6

#### Preparation of benzyl 4,4,4-trifluoro-3(R)-hydroxybutyrate

5           140 g of glucose and 50 mg of NADP<sup>+</sup> were added  
to 800 ml of potassium phosphate buffer (0.1 M, pH 6.0)  
containing E. coli DH5/pKAR,pKKGDH at an OD<sub>650nm</sub> of 9.0.  
400 ml of butyl acetate containing 70 g of benzyl  
4,4,4-trifluoroacetoacetate were added and the  
10 resulting mixture was placed in a 2 l fermenter,  
stirred at 400 rpm and gassed with air (400 ml/min).  
The pH was kept at pH 6.0 by adding 1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. A  
further 50 mg of NADP<sup>+</sup> were added 5 h after starting  
the fermenter. After 24 h, the organic phase contained  
15 6 g of benzyl 4,4,4-trifluoro-3(R)-hydroxybutyrate  
having an ee value of >99.9%, corresponding to a molar  
yield of 9%.

### Example 7

#### Preparation of 2-ethoxyethyl 4,4,4-trifluoro-3(R)-hydroxybutyrate

20           105 g of glucose and 37.5 mg of NADP<sup>+</sup> were  
added to 600 ml of potassium phosphate buffer (0.1 M,  
25 pH 6.0) containing E. coli DH5/pKAR,pKKGDH at an OD<sub>650nm</sub>  
of 10.2. 300 ml of butyl acetate containing 35 g of  
ethoxyethyl 4,4,4-trifluoroacetoacetate were added and  
the resulting mixture was placed in a 2 l fermenter,  
stirred at 400 rpm and gassed with air (300 ml/min).  
30 The pH was kept at pH 6.0 by adding 1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. A  
further 37.5 mg of NADP<sup>+</sup> were added 5 h after starting  
the fermenter. After 24 h, the organic phase contained  
4 g of ethoxyethyl 4,4,4-trifluoro-3(R)-hydroxybutyrate  
having an ee value of 98.6%, corresponding to a molar  
35 yield of 12%.

00622385-110600

Preparation of 2-(2-ethoxyethoxy)ethyl 4,4,4-trifluoro-3(R)-hydroxybutyrate

5

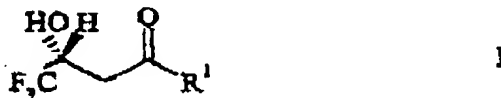
## 20

25

30

Patent Claims

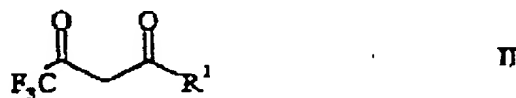
1. Process for preparing trifluoro-3(R)-hydroxybutyric acid derivatives of the generic formula



wherein

- $R^1$  -OR<sup>2</sup>, wherein R<sup>2</sup> is hydrogen, C<sub>1-10</sub> alkyl, C<sub>1-10</sub> alkenyl, C<sub>3-8</sub> cycloalkyl, aryl, alkoxyalkyl or alkoxyalkoxyalkyl,  
 - NR<sup>3</sup>R<sup>4</sup>, wherein R<sup>3</sup> and R<sup>4</sup> are identical or different and are hydrogen, C<sub>1-10</sub> alkyl, C<sub>1-10</sub> alkenyl, C<sub>3-8</sub> cycloalkyl or aryl, or  
 - SR<sup>5</sup>, wherein R<sup>5</sup> is hydrogen, C<sub>1-10</sub> alkyl, C<sub>1-10</sub> alkenyl, aryl or C<sub>3-8</sub> cycloalkyl,

comprising the conversion of a trifluoroacetoacetic acid derivative of the generic formula



wherein R<sup>1</sup> has the cited meaning, by means of microorganisms of the Escherichia species that are transformed with a gene coded for an enzyme which is capable of reducing a carbonyl function, or by means of a cell-free enzyme extract of this microorganism.

2. Process according to claim 1, characterized in that the biotransformation is conducted by means of microorganisms of the Escherichia coli JM109 species, Escherichia coli HB101 or Escherichia coli DH5.

3. Process according to one of claims 1 or 2, characterized in that the biotransformation is conducted by means of microorganisms of the Escherichia coli JM109 species, Escherichia coli HB101 or Escherichia coli DH5, which are transformed with genes that are coded for an enzyme, which is capable of reducing a carbonyl function, as well as for a glucose dehydrogenase.

4. Process according to claim 3, characterized in that the biotransformation is conducted by means of microorganisms of the Escherichia coli JM109 species or the Escherichia coli DH5 species, which are transformed with the plasmids pKAR and pKKGDH, as filed under the filing numbers DSM 11902 or DSM 12566.

5. Process according to one of claims 1 to 4, characterized in that the biotransformation is conducted at a temperature between 5 and 60° C.

6. Process according to one of claims 1 to 5, characterized in that the biotransformation is conducted at a pH between 5 and 10.

005017 5822250


BUDAPESTER VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE  
ANERKENNUNG DER HINTERLEGUNG VON MIKROORGANISMEN  
FÜR DIE ZWECKE VON PATENTVERFAHREN

INTERNATIONALES FORMBLATT

Lonza AG

CH-3930 Visp

EMPFANGSBESTÄTIGUNG BEI ERSTHINTERLEGUNG,  
ausgestellt gemäß Regel 7.1 von der unten angegebenen  
INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE

|  |   |
|--|---|
| <b>I. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS</b>  |   |
| Vom HINTERLEGER zugeteiltes Bezugszeichen:<br>DH5/pKAR/pKKGDH  | Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE<br>zugeteilte EINGANGSNUMMER:<br><br>DSM 12566  |
| <b>II. WISSENSCHAFTLICHE BESCHREIBUNG UND/ODER VORGESCHLAGENE TAXONOMISCHE BEZEICHNUNG</b>   |   |
| Mit dem unter I. bezeichneten Mikroorganismus wurde<br><br><input checked="" type="checkbox"/> eine wissenschaftliche Beschreibung<br><input checked="" type="checkbox"/> eine vorgeschlagene taxonomische Bezeichnung<br><br>eingereicht.<br>(Zutreffendes ankreuzen).                                      |   |
| <b>III. EINGANG UND ANNAHME</b>  |   |
| Diese internationale Hinterlegungsstelle nimmt den unter I bezeichneten Mikroorganismus an, der bei ihr am 1998-12-07 (Datum der Ersthinterlegung) <sup>1</sup> eingegangen ist.   |   |
| <b>IV. EINGANG DES ANTRAGS AUF UMWANDLUNG</b>  |   |
| Der unter I bezeichnete Mikroorganismus ist bei dieser Internationalen Hinterlegungsstelle am eingegangen (Datum der Ersthinterlegung) und ein Antrag auf Umwandlung dieser Ersthinterlegung in eine Hinterlegung gemäß Budapest Vertrag ist am eingegangen (Datum des Eingangs des Antrags auf Umwandlung). |   |
| <b>V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE</b>   |   |
| Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH<br><br>Anschrift: Mascheroder Weg 1b<br>D-38124 Braunschweig  | Unterschrift(en) der zur Vertretung der internationalen Hinterlegungsstelle befugten Person(en) oder des (der) von ihr ermächtigten Bediensteten:<br><br><br>Datum: 1998-12-10 |

BUDAPESTER VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE  
ANERKENNUNG DER HINTERLEGUNG VON MIKROORGANISMEN  
FÜR DIE ZWECKE VON PATENTVERFAHREN

INTERNATIONALES FORMBLATT

Lonza AG

CH-3930 Visp

LEBENSFÄHIGKEITSBESCHEINIGUNG  
ausgestellt gemäß Regel 10.2 von der unten angegebenen  
INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE

|  |  |
|--|--|
| <p><b>I. HINTERLEGER</b></p> <p>Name: Lonza AG</p> <p>Anschrift: CH-3930 Visp</p>  | <p><b>II. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS</b></p> <p>Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE<br/>zugeteilte EINGANGSNUMMER:<br/><br/>DSM 12566</p> <p>Datum der Hinterlegung oder Weiterleitung<sup>1</sup>:<br/><br/>1998-12-07</p> |
| <p><b>III. LEBENSFÄHIGKEITSBESCHEINIGUNG</b></p> <p>Die Lebensfähigkeit des unter II genannten Mikroorganismus ist am 1998-12-07<sup>2</sup> geprüft worden.<br/>Zu diesem Zeitpunkt war der Mikroorganismus</p> <p>(X)<sup>3</sup> lebensfähig<br/>( )<sup>3</sup> nicht mehr lebensfähig</p> |  |
| <p><b>IV. BEDINGUNGEN, UNTER DENEN DIE LEBENSFÄHIGKEITSPRÜFUNG DURCHGEFÜHRT WORDEN IST<sup>4</sup></b></p><br><br>   |  |
| <p><b>V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE</b></p>  |  |
| <p>Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON<br/>MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH</p> <p>Anschrift: Mascheroder Weg 1b<br/>D-38124 Braunschweig</p>  | <p>Unterschrift(en) der zur Vertretung der internationalen Hinterlegungsstelle<br/>befugten Person(en) oder des (der) von ihr ermächtigten Bediensteten:</p> <p style="text-align: center;"><i>V. Weiss</i></p> <p>Datum: 1998-12-10</p>   |

<sup>1</sup> Angabe des Datums der Ersthinterlegung. Wenn eine erneute Hinterlegung oder eine Weiterleitung vorgenommen worden ist, Angabe des Datums der jeweils letzten erneuten Hinterlegung oder Weiterleitung.  
<sup>2</sup> In den in Regel 10.2 Buchstabe a Ziffer ii und iii vorgesehenen Fällen Angabe der letzten Lebensfähigkeitsprüfung.  
<sup>3</sup> Zutreffendes ankreuzen.


BUDAPESTER VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE  
ANERKENNUNG DER HINTERLEGUNG VON MIKROORGANISMEN  
FÜR DIE ZWECKE VON PATENTVERFAHREN

INTERNATIONALES FORMBLATT

Lonza AG  
Abt. Biotechnologie/  
Forschung  
Lonzastr.

CH-3930 Visp

EMPFANGSBESTÄTIGUNG BEI ERSTHINTERLEGUNG,  
ausgestellt gemäß Regel 7.1 von der unten angegebenen  
INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE

|  |  |
|--|--|
| I. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS   |  |
| Vom HINTERLEGER zugeteiltes Bezugszeichen:<br><br>JM 109 / pKAR pKKGDH   | Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE<br>zugeteilte EINGANGSNUMMER:<br><br>DSM 11902   |
| II. WISSENSCHAFTLICHE BESCHREIBUNG UND/ODER VORGESCHLAGENE TAXONOMISCHE BEZEICHNUNG  |  |
| Mit dem unter I. bezeichneten Mikroorganismus wurde<br><br><input checked="" type="checkbox"/> eine wissenschaftliche Beschreibung<br><input checked="" type="checkbox"/> eine vorgeschlagene taxonomische Bezeichnung<br><br>eingereicht.<br>(Zutreffendes ankreuzen).                                      |  |
| III. EINGANG UND ANNAHME   |  |
| Diese internationale Hinterlegungsstelle nimmt den unter I bezeichneten Mikroorganismus an, der bei ihr am 1997-12-16 (Datum der Ersthinterlegung) <sup>1</sup> eingegangen ist.   |  |
| IV. EINGANG DES ANTRAGS AUF UMWANDLUNG   |  |
| Der unter I bezeichnete Mikroorganismus ist bei dieser Internationalen Hinterlegungsstelle am eingegangen (Datum der Ersthinterlegung) und ein Antrag auf Umwandlung dieser Ersthinterlegung in eine Hinterlegung gemäß Budapest Vertrag ist am eingegangen (Datum des Eingangs des Antrags auf Umwandlung). |  |
| V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE  |  |
| Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON<br>MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH<br><br>Anschrift: Mascheroder Weg 1b<br>D-38124 Braunschweig   | Unterschrift(en) der zur Vertretung der internationalen Hinterlegungsstelle<br>befugten Person(en) oder des (der) von ihr ermächtigten Bediensteten:<br><br><br>Datum: 1998-01-08 |




BUDAPESTER VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE  
ANERKENNUNG DER HINTERLEGUNG VON MIKROORGANISMEN  
FÜR DIE ZWECKE VON PATENTVERFAHREN

INTERNATIONALES FORMBLATT

Lonza AG  
Abt. Biotechnologie/  
Forschung  
Lonzastr.

CH-3930 Visp

LEBENSFÄHIGKEITSBESCHEINIGUNG  
ausgestellt gemäß Regel 10.2 von der unten angegebenen  
INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE

|   |  |
|---|--|
| <b>I. HINTERLEGER</b><br><br>Name: Lonza AG<br>Abt. Biotechnologie/<br>Anschrift: Forschung<br>Lonzastr.<br><br>CH-3930 Visp  | <b>II. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS</b><br><br>Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE<br>zugeteilte EINGANGSNUMMER:<br>DSM 11902<br><br>Datum der Hinterlegung oder Weiterleitung <sup>1</sup> :<br>1997-12-16   |
| <b>III. LEBENSFÄHIGKEITSBESCHEINIGUNG</b><br><br>Die Lebensfähigkeit des unter II genannten Mikroorganismus ist am 1997-12-16 <sup>2</sup> geprüft worden.<br>Zu diesem Zeitpunkt war der Mikroorganismus<br><br><div style="margin-left: 40px;"> <input checked="" type="checkbox"/> lebensfähig<br/> <input type="checkbox"/> nicht mehr lebensfähig         </div> |  |
| <b>IV. BEDINGUNGEN, UNTER DENEN DIE LEBENSFÄHIGKEITSPRÜFUNG DURCHGEFÜHRT WORDEN IST<sup>4</sup></b><br><br><div style="height: 40px;"></div>  |  |
| <b>V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE</b>  |  |
| Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON<br>MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH<br><br>Anschrift: Mascheroder Weg 1b<br>D-38124 Braunschweig  | Unterschrift(en) der zur Vertretung der internationalen Hinterlegungsstelle<br>befugten Person(en) oder des (der) von ihr ermächtigten Bediensteten:<br><br><div style="text-align: center; margin-top: 20px;">  </div> Datum: 1998-01-08 |

<sup>1</sup> Angabe des Datums der Ersthinterlegung. Wenn eine erneute Hinterlegung oder eine Weiterleitung vorgenommen worden ist, Angabe des Datums der jeweils letzten erneuten Hinterlegung oder Weiterleitung.  
<sup>2</sup> In den in Regel 10.2 Buchstabe a Ziffer ii und iii vorgesehenen Fällen Angabe der letzten Lebensfähigkeitsprüfung.  
<sup>3</sup> Zutreffendes ankreuzen.

# VERTRAG ÜBER INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

## PCT

REC'D 16 MAY 2000

WIPO

PCT

### INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)


|  |   |   |
|--|---|---|
| Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts<br>L07839  | <b>WEITERES VORGEHEN</b> siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsbericht (Formblatt PCT/IPEA/416) |   |
| Internationales Aktenzeichen<br>PCT/EP99/01017   | Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr)<br>18/02/1999   | Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag)<br>18/02/1998 |
| Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK<br>C12N15/53 |   |   |
| Anmelder<br>LONZA AG et al.  |   |   |

- Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationale vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
- Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 4 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.
  - ☒ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).

Diese Anlagen umfassen insgesamt 2 Blätter.

- Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Berichts
- II ☐ Priorität
- III ☐ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderische Tätigkeit und der gewerbliche Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☐ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☐ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☐ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

|  |   |
|--|---|
| Datum der Einreichung des Antrags<br><br>13/08/1999  | Datum der Fertigstellung dieses Berichts<br><br>11.05.00                          |
| Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:<br><br> Europäisches Patentamt<br>D-80298 München<br>Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d<br>Fax: +49 89 2399 - 4465 | Bevollmächtigter Bediensteter<br><br>Vollbach, S<br><br>Tel. Nr. +49 89 2399 8715 |



**I. Grundlage des Berichts**

1. Dieser Bericht wurde erstellt auf der Grundlage (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigefügt, weil sie keine Änderungen enthalten.*):

**Beschreibung, Seiten:**

1-15                      ursprüngliche Fassung

**Patentansprüche, Nr.:**

1-6                      eingegangen am                      29/03/2000    mit Schreiben vom    28/03/2000

**Zeichnungen, Blätter:**

1/1                      ursprüngliche Fassung

2. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- ☐ Beschreibung,              Seiten:  
☐ Ansprüche,                Nr.:  
☐ Zeichnungen,              Blatt:

3. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)):

4. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

**V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung**

**1. Feststellung**

|                                |                 |         |
|--------------------------------|-----------------|---------|
| Neuheit (N)                    | Ja: Ansprüche   | 1-6     |
|                                | Nein: Ansprüche |         |
| Erfinderische Tätigkeit (ET)   | Ja: Ansprüche   | 4       |
|                                | Nein: Ansprüche | 1-3,5,6 |
| Gewerbliche Anwendbarkeit (GA) | Ja: Ansprüche   | 1-6     |
|                                | Nein: Ansprüche |         |

**INTERNATIONALER VORLÄUFIGER  
PRÜFUNGSBERICHT**

---

Internationales Aktenzeichen PCT/EP99/01017

**2. Unterlagen und Erklärungen**

**siehe Beiblatt**

1. Im folgenden Bescheid wird auf nachstehendes Dokument Bezug genommen:

D1: KITA: APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, Bd. 62, Nr. 7, Juli 1996, Seiten 2303-2310, XP002105940

2. Die vorliegende Anmeldung betrifft ein biotechnologisches Verfahren zur Herstellung von Trifluor-3(r)-hydroxybuttersäurederivaten mittels Mikroorganismen, die befähigt sind eine Carbonylfunktion zu reduzieren. Die verwendeten Mikroorganismen gehören der Gattung E.coli an. Durch geeignete Transformation mit den Genen für eine NADPH-abhängigen Aldehyd-Reduktase und eine Glucosedehydrogenase (NADPH-Generator oder-Regenerator) wurde diesen Zellen die gewünschte Fähigkeit verliehen.

3. D1 beschreibt die Herstellung eines E.coli Stammes, der mit der NADPH-abhängigen Aldehyd Reduktase gemäß der vorliegenden Anmeldung transformiert wurde. Es wird beschrieben, daß dieses Enzym in der Lage ist eine große Vielzahl von Carbonylverbindungen zu reduzieren. Die Verwendung in der Biotransformation von ethyl (R)-4-chloro-3-hydroxybutonate wird vorgeschlagen.

4. Es wird die Auffassung vertreten, daß für den allgemeinen Verfahrensanspruch 1 eine erfinderische Tätigkeit nicht anerkannt werden kann. In D1 ist die Verwendung eines Enzyms, welches Carbonylfunktionen reduzieren kann, in der Biotransformation vorgeschlagen, auch wenn D1 eine andere Zielsetzung hat. Zudem ist die Klasse der Enzyme, die Carbonylfunktionen reduzieren können unverhältnismäßig groß, beachtet man, daß D1 dasselbe Enzym beschreibt, wie in der vorliegenden Anmeldung verwendet wurde. Die prüfende Behörde vertritt die Meinung, daß die Erfindung im Hinblick auf D1 darin besteht, daß ein effizientes Ergebnis zu erhalten ist, wenn E. coli zusätzlich mit dem Enzym Glucosedehydrogenase transformiert wird. Entsprechend kann für den Verfahrensanspruch 4 eine erfinderische Tätigkeit anerkannt werden. Für die übrigen Ansprüche sind die Erfordernisse des Artikel 33(3) PCT nicht erfüllt.

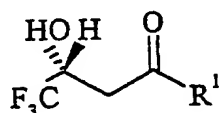
11 29.03.00

16

# Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von Trifluor-3(R)-hydroxybuttersäurederivaten der allgemeinen Formel

5



I

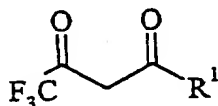
worin

10

- $R^1$   $-OR^2$ , worin  $R^2$  Wasserstoff,  $C_{1-10}$ -Alkyl,  $C_{1-10}$ -Alkenyl,  $C_{3-8}$ -Cycloalkyl, Aryl, Alkoxyalkyl oder Alkoxyalkoxyalkyl ist,  
 $-NR^3R^4$ , worin  $R^3$  und  $R^4$  gleich oder verschieden sind und für Wasserstoff,  $C_{1-10}$ -Alkyl,  $C_{1-10}$ -Alkenyl,  $C_{3-8}$ -Cycloalkyl oder Aryl stehen, oder  
 $-SR^5$ , worin  $R^5$  Wasserstoff,  $C_{1-10}$ -Alkyl,  $C_{1-10}$ -Alkenyl, Aryl oder  $C_{3-8}$ -Cycloalkyl ist, bedeutet,

15

umfassend die Umsetzung eines Trifluoracetessigsäurederivats der allgemeinen Formel



II

20

worin  $R^1$  die genannte Bedeutung hat, mittels Mikroorganismen der Gattung Escherichia, die mit einem Gen transformiert sind, das für ein Enzym codiert, welches befähigt ist, eine Carbonylfunktion zu reduzieren, oder mittels einem zellfreien Enzymextrakt dieser Mikroorganismen.

25

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Biotransformation mittels Mikroorganismen der Spezies Escherichia coli JM109, Escherichia coli HB 101 oder Escherichia coli DH5 durchgeführt wird..

M 29.03.00  
17

3. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Biotransformation mittels Mikroorganismen der Spezies *Escherichia coli* JM109, *Escherichia coli* HB101 oder *Escherichia coli* DH5 durchgeführt wird, die mit Genen transformiert sind, die sowohl für ein Enzym, welches befähigt ist, eine Carbonylfunktion zu reduzieren, als auch für eine Glucosedehydrogenase codieren.
- 5
4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Biotransformation mittels Mikroorganismen der Spezies *Escherichia coli* JM109 oder der Spezies *Escherichia coli* DH5 durchgeführt wird, die mit den Plasmiden pKAR und pKKGDH transformiert sind, wie hinterlegt unter der Hinterlegungsnummer DSM 11902 bzw. DSM 12566.
- ( 10
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Biotransformation bei einer Temperatur von 5 bis 60°C durchgeführt wird.
- 15 6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass die Biotransformation bei einem pH von 5 bis 10 durchgeführt wird.

Joco  
**Translation**  
 09622385

PATENT COOPERATION TREATY

**PCT**

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

10

|  |   |   |
|--|---|---|
| Applicant's or agent's file reference<br>L07839  | <b>FOR FURTHER ACTION</b> See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416) |   |
| International application No.<br>PCT/EP99/01017  | International filing date (day/month/year)<br>18 February 1999 (18.02.99)   | Priority date (day/month/year)<br>18 February 1998 (18.02.98) |
| International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC<br>C12N 15/53 |   |   |
| Applicant<br>LONZA AG  |   |   |

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of 4 sheets, including this cover sheet.

☒ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of 2 sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☐ Certain observations on the international application

|   |   |
|---|---|
| Date of submission of the demand<br>13 August 1999 (13.08.99) | Date of completion of this report<br>11 May 2000 (11.05.2000) |
| Name and mailing address of the IPEA/EP                       | Authorized officer  |
| Facsimile No.   | Telephone No.   |



# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP99/01017

## I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of *(Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.)*:

☐ the international application as originally filed.

☒ the description, pages 1-15, as originally filed,  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_,  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.

☒ the claims, Nos. \_\_\_\_\_, as originally filed,  
Nos. \_\_\_\_\_, as amended under Article 19,  
Nos. \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
Nos. 1-6, filed with the letter of 29 March 2000 (29.03.2000),  
Nos. \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.

☒ the drawings, sheets/fig 1/1, as originally filed,  
sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_,  
sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

☐ the description, pages \_\_\_\_\_

☐ the claims, Nos. \_\_\_\_\_

☐ the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_

3. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:

# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.  
PCT/EP 99/01017

## V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

### 1. Statement

|                               |        |           |     |
|-------------------------------|--------|-----------|-----|
| Novelty (N)                   | Claims | 1-6       | YES |
|                               | Claims |           | NO  |
| Inventive step (IS)           | Claims | 4         | YES |
|                               | Claims | 1-3, 5, 6 | NO  |
| Industrial applicability (IA) | Claims | 1-6       | YES |
|                               | Claims |           | NO  |

### 2. Citations and explanations

1. The following document is referred to in the present report:

D1: KITA: APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY,  
Vol. 62, N° 7, July 1996, pages 2303-2310,  
XP002105940

2. The present application concerns a biotechnological method for producing trifluoro-3(r)-hydroxybutyric acid derivatives using micro-organisms capable of reducing a carbonyl function. The micro-organisms used are drawn from the *E. Coli* family. The desired capability was obtained in these cells by means of a suitable transformation using the genes for an NADPH-dependent aldehyde reductase and a glucose hydrogenase (NADPH generator or regenerator).

3. D1 describes the production of an *E. Coli* strain transformed with the NADPH-dependent aldehyde reductase as in the present application. D1 indicates that this enzyme is capable of reducing a large number of carbonyl compounds. D1 suggests the use of ethyl (R)-4-chloro-3-hydroxybutonates for the biotransformation.

4. The examining authority takes the view that Claim 1, which is a general method claim, can not be considered as involving an inventive step. The use of an enzyme capable of reducing carbonyl functions is suggested in D1 for the biotransformation, even though D1 has a different technical object.

Furthermore, the class of enzymes which are capable of reducing carbonyl functions is excessively large, considering that D1 describes the same enzyme as the one used in the present application. The examining authority considers that the inventive step in relation to D1 lies in the fact that an efficient result can be obtained where *E. coli* is transformed with the enzyme glucose dehydrogenase. Thus, method Claim 4 can be considered to involve an inventive step. The remaining claims do not satisfy the requirements of PCT Article 33(3).

TRANSLATION**INTERNATIONAL INTERIM  
EXAMINATION REPORT - SUPPLEMENT**

International Application No.: PCT/EP99/01017

---

1. The following communication refers to the document below:

D1: KITA: APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, volume 62, no. 7, July 1996, pages 2303-2310, XP002105940

2. This application involves a biotechnological process for preparing trifluoro-3(r)-hydroxybutyric acid derivatives by microorganisms that are capable of reducing a carbonyl function. The microorganisms used belong to the *E. coli* species. The desired capability was conferred on these cells by suitable transformation with the genes for a NADPH-dependent aldehyde reductase and a glucose dehydrogenase (NADPH generator or regenerator).

3. D1 describes the preparation of an *E. coli* strain that was transformed with the NADPH-dependent aldehyde reductase according to the subject application. According to the description, this enzyme is capable of reducing a large number of carbonyl compounds. The use of ethyl (R)-4-chloro-3-hydroxy butonate (sic) in the biotransformation is proposed.

4. It is held that inventive activity cannot be recognized for the generic process claim 1. D1 proposes the use, in the biotransformation, of an enzyme, which can reduce carbonyl functions even though D1 has another objective.

In addition, the class of the enzymes that can reduce carbonyl functions is disproportionately large. It is observed that D1 describes the same enzyme as was used in the subject application. The examining body is of the opinion that the invention, in view of D1, is that an effective result can be obtained if *E. coli* is transformed in addition with the enzyme glucose dehydrogenase. Correspondingly, inventive activity can be recognized for process claim 4. The remaining claims do not fulfill the requirements of Article 33(3) PC.

# PCP

## ANTRAG

Der Unterzeichnete beantragt, daß die vorliegende internationale Anmeldung nach dem Vertrag über die internationale Zusammenarbeit auf dem Gebiet des Patentwesens behandelt wird.

# ANNEX A

Vorname des Anmeldeamts auszufüllen

Internationales Aktenzeichen

Internationales Anmeldedatum

Name des Anmeldeamts und "PCT International Application"

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts (falls gewünscht) (max. 12 Zeichen) L07839 L.P.1778

**Feld Nr. I BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG**  
Verfahren zur Herstellung von Trifluor-3(R)-hydroxybuttersäure-derivaten

### Feld Nr. II ANMELDER

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

LONZA AG  
(Geschäftsleitung: 4002 Basel)  
CH-3945 Gampel/Wallis  
Schweiz

☐ Diese Person ist gleichzeitig Erfinder

Telefonnr.:

Telefaxnr.:

Fernschreibnr.:

Staatsangehörigkeit (Staat):  
CH

Sitz oder Wohnsitz (Staat):  
CH

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

☐ alle Bestimmungsstaaten

☒ alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika

☐ nur die Vereinigten Staaten von Amerika

☐ die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

### Feld Nr. III WEITERE ANMELDER UND/ODER (WEITERE) ERFINDER

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

PETERSEN, Michael  
Sandstrasse 7  
CH-3930 Visp (Kanton Wallis)  
Schweiz

Diese Person ist:

☐ nur Anmelder

☒ Anmelder und Erfinder

☐ nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Staatsangehörigkeit (Staat):  
DE

Sitz oder Wohnsitz (Staat):  
CH

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

☐ alle Bestimmungsstaaten

☐ alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika

☒ nur die Vereinigten Staaten von Amerika

☐ die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

☒ Weitere Anmelder und/oder (weitere) Erfinder sind auf einem Fortsetzungsblatt angegeben.

### Feld Nr. IV ANWALT ODER GEMEINSAMER VERTRETER; ODER ZUSTELLANSCHRIFT

Die folgende Person wird hiermit bestellt/ist bestellt worden, um für den (die) Anmelder vor den zuständigen internationalen Behörden in folgender Eigenschaft zu handeln als: ☒ Anwalt ☐ gemeinsamer Vertreter

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben.)

RITTHALER, Wolfgang  
WINTER, BRANDL & PARTNER  
Alois-Steinecker-Strasse 22  
D-85354 Freising  
Deutschland

Telefonnr.:

08161/930-0

Telefaxnr.:

08161/930-100

Fernschreibnr.:

☐ Zustellanschrift: Dieses Kästchen ist anzukreuzen, wenn kein Anwalt oder gemeinsamer Vertreter bestellt ist und statt dessen im obigen Feld eine spezielle Zustellanschrift angegeben ist.

## Fortsetzung von Feld Nr. III WEITERE ANMELDER UND/ODER (WEITERE) ERFINDER

Wird keines der folgenden Felder benutzt, so sollte dieses Blatt dem Antrag nicht beigelegt werden.

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

BIRCH, Olwen  
Weingartenweg 16  
CH-3930 Visp (Kanton Wallis)  
Schweiz

Diese Person ist:

☐ nur Anmelder

☒ Anmelder und Erfinder

☐ nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Staatsangehörigkeit (Staat):  
GB

Sitz oder Wohnsitz (Staat):  
CH

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

☐ alle Bestimmungsstaaten

☐ alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika

☒ nur die Vereinigten Staaten von Amerika

☐ die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

SHIMIZU, Sakayu  
Sakyo-Ku  
Kyoto 606-01  
Japan

Diese Person ist:

☐ nur Anmelder

☒ Anmelder und Erfinder

☐ nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Staatsangehörigkeit (Staat):  
JP

Sitz oder Wohnsitz (Staat):  
JP

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

☐ alle Bestimmungsstaaten

☐ alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika

☒ nur die Vereinigten Staaten von Amerika

☐ die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

KIENER, Andreas  
Meisenweg 5  
CH-3930 Visp (Kanton Wallis)  
Schweiz

Diese Person ist:

☐ nur Anmelder

☒ Anmelder und Erfinder

☐ nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Staatsangehörigkeit (Staat):  
CH

Sitz oder Wohnsitz (Staat):  
CH

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

☐ alle Bestimmungsstaaten

☐ alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika

☒ nur die Vereinigten Staaten von Amerika

☐ die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

HISCHIER, Marie-Luise  
Sandstrasse 1  
CH-3930 Visp (Kanton Wallis)  
Schweiz

Diese Person ist:

☐ nur Anmelder

☒ Anmelder und Erfinder

☐ nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Staatsangehörigkeit (Staat):  
CH

Sitz oder Wohnsitz (Staat):  
CH

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

☐ alle Bestimmungsstaaten

☐ alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika

☒ nur die Vereinigten Staaten von Amerika

☐ die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

☒ Weitere Anmelder und/oder (weitere) Erfinder sind auf einem zusätzlichen Fortsetzungsblatt angegeben.

Siehe Anmerkungen zu diesem Antragsformular

## Fortsetzung von Feld Nr. III WEITERE ANMELDER UND/ODER (WEITERE) ERFINDER

Wird keines der folgenden Felder benutzt, so sollte dieses Blatt dem Antrag nicht beigelegt werden.

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

THÖNI, Susanne  
Bahnhofstrasse 3  
CH-3904 Naters  
Schweiz

Diese Person ist:

☐ nur Anmelder

☒ Anmelder und Erfinder

☐ nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Staatsangehörigkeit (Staat):

CH

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

CH

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

☐ alle Bestimmungsstaaten

☐ alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika

☒ nur die Vereinigten Staaten von Amerika

☐ die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

Diese Person ist:

☐ nur Anmelder

☐ Anmelder und Erfinder

☐ nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Staatsangehörigkeit (Staat):

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

☐ alle Bestimmungsstaaten

☐ alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika

☐ nur die Vereinigten Staaten von Amerika

☐ die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

Diese Person ist:

☐ nur Anmelder

☐ Anmelder und Erfinder

☐ nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Staatsangehörigkeit (Staat):

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

☐ alle Bestimmungsstaaten

☐ alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika

☐ nur die Vereinigten Staaten von Amerika

☐ die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

Diese Person ist:

☐ nur Anmelder

☐ Anmelder und Erfinder

☐ nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Staatsangehörigkeit (Staat):

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

☐ alle Bestimmungsstaaten

☐ alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika

☐ nur die Vereinigten Staaten von Amerika

☐ die im Zusatzfeld angegebenen Staaten



Weitere Anmelder und/oder (weitere) Erfinder sind auf einem zusätzlichen Fortsetzungsblatt angegeben.

Feld Nr. V BESTIMMUNG VON STAATEN

Die folgenden Bestimmungen nach Regel 4.9 Absatz a werden hiermit vorgenommen (bitte die entsprechenden Kästchen ankreuzen; wenigstens ein Kästchen muß angekreuzt werden):

Regionales Patent

- ☒ AP ARIPO-Patent: GH Ghana, GM Gambia, KE Kenia, LS Lesotho, MW Malawi, SD Sudan, SZ Swasiland, UG Uganda, ZW Simbabwe und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat des Harare-Protokolls und des PCT ist
- ☒ EA Eurasisches Patent: AM Armenien, AZ Aserbaidshan, BY Belarus, KG Kirgisistan, KZ Kasachstan, MD Republik Moldau, RU Russische Föderation, TJ Tadschikistan, TM Turkmenistan und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat des Eurasischen Patentübereinkommens und des PCT ist
- ☒ EP Europäisches Patent: AT Österreich, BE Belgien, CH und LI Schweiz und Liechtenstein, CY Zypern, DE Deutschland, DK Dänemark, ES Spanien, FI Finnland, FR Frankreich, GB Vereinigtes Königreich, GR Griechenland, IE Irland, IT Italien, LU Luxemburg, MC Monaco, NL Niederlande, PT Portugal, SE Schweden und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat des Europäischen Patentübereinkommens und des PCT ist
- ☒ OA OAPI-Patent: BF Burkina Faso, BJ Benin, CF Zentralafrikanische Republik, CG Kongo, CI Côte d'Ivoire, CM Kamerun, GA Gabun, GN Guinea, ML Mali, MR Mauretanien, NE Niger, SN Senegal, TD Tschad, TG Togo und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat der OAPI und des PCT ist (falls eine andere Schutzrechtsart oder ein sonstiges Verfahren gewünscht wird, bitte auf der gepunkteten Linie angeben) .....

Nationales Patent (falls eine andere Schutzrechtsart oder ein sonstiges Verfahren gewünscht wird, bitte auf der gepunkteten Linie angeben):

- |  |  |
|--|--|
| <input checked="" type="checkbox"/> AL Albanien .....                          | <input checked="" type="checkbox"/> LS Lesotho .....   |
| <input checked="" type="checkbox"/> AM Armenien .....                          | <input checked="" type="checkbox"/> LT Litauen .....   |
| <input checked="" type="checkbox"/> AT Österreich .....                        | <input checked="" type="checkbox"/> LU Luxemburg .....   |
| <input checked="" type="checkbox"/> AU Australien .....                        | <input checked="" type="checkbox"/> LV Lettland .....  |
| <input checked="" type="checkbox"/> AZ Aserbaidshan .....                      | <input checked="" type="checkbox"/> MD Republik Moldau .....   |
| <input checked="" type="checkbox"/> BA Bosnien-Herzegowina .....               | <input checked="" type="checkbox"/> MG Madagaskar .....  |
| <input checked="" type="checkbox"/> BB Barbados .....                          | <input checked="" type="checkbox"/> MK Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien .....   |
| <input checked="" type="checkbox"/> BG Bulgarien .....                         | <input checked="" type="checkbox"/> MN Mongolei .....  |
| <input checked="" type="checkbox"/> BR Brasilien .....                         | <input checked="" type="checkbox"/> MW Malawi .....  |
| <input checked="" type="checkbox"/> BY Belarus .....                           | <input checked="" type="checkbox"/> MX Mexiko .....  |
| <input checked="" type="checkbox"/> CA Kanada .....                            | <input checked="" type="checkbox"/> NO Norwegen .....  |
| <input checked="" type="checkbox"/> CH und LI Schweiz und Liechtenstein .....  | <input checked="" type="checkbox"/> NZ Neuseeland .....  |
| <input checked="" type="checkbox"/> CN China .....                             | <input checked="" type="checkbox"/> PL Polen .....   |
| <input checked="" type="checkbox"/> CU Kuba .....                              | <input checked="" type="checkbox"/> PT Portugal .....  |
| <input checked="" type="checkbox"/> CZ Tschechische Republik .....             | <input checked="" type="checkbox"/> RO Rumänien .....  |
| <input checked="" type="checkbox"/> DE Deutschland .....                       | <input checked="" type="checkbox"/> RU Russische Föderation .....  |
| <input checked="" type="checkbox"/> DK Dänemark .....                          | <input checked="" type="checkbox"/> SD Sudan .....   |
| <input checked="" type="checkbox"/> EE Estland .....                           | <input checked="" type="checkbox"/> SE Schweden .....  |
| <input checked="" type="checkbox"/> ES Spanien .....                           | <input checked="" type="checkbox"/> SG Singapur .....  |
| <input checked="" type="checkbox"/> FI Finnland .....                          | <input checked="" type="checkbox"/> SI Slowenien .....   |
| <input checked="" type="checkbox"/> GB Vereinigtes Königreich .....            | <input checked="" type="checkbox"/> SK Slowakei .....  |
| <input checked="" type="checkbox"/> GE Georgien .....                          | <input checked="" type="checkbox"/> SL Sierra Leone .....  |
| <input checked="" type="checkbox"/> GH Ghana .....                             | <input checked="" type="checkbox"/> TJ Tadschikistan .....   |
| <input checked="" type="checkbox"/> GM Gambia .....                            | <input checked="" type="checkbox"/> TM Turkmenistan .....  |
| <input type="checkbox"/> GW Guinea-Bissau .....                                | <input checked="" type="checkbox"/> TR Türkei .....  |
| <input checked="" type="checkbox"/> HR Kroatien .....                          | <input checked="" type="checkbox"/> TT Trinidad und Tobago .....   |
| <input checked="" type="checkbox"/> HU Ungarn .....                            | <input checked="" type="checkbox"/> UA Ukraine .....   |
| <input checked="" type="checkbox"/> ID Indonesien .....                        | <input checked="" type="checkbox"/> UG Uganda .....  |
| <input checked="" type="checkbox"/> IL Israel .....                            | <input checked="" type="checkbox"/> US Vereinigte Staaten von Amerika .....  |
| <input checked="" type="checkbox"/> IS Island .....                            | .....  |
| <input checked="" type="checkbox"/> JP Japan .....                             | <input checked="" type="checkbox"/> UZ Usbekistan .....  |
| <input checked="" type="checkbox"/> KE Kenia .....                             | <input checked="" type="checkbox"/> VN Vietnam .....   |
| <input checked="" type="checkbox"/> KG Kirgisistan .....                       | <input checked="" type="checkbox"/> YU Jugoslawien .....   |
| <input checked="" type="checkbox"/> KP Demokratische Volksrepublik Korea ..... | <input checked="" type="checkbox"/> ZW Simbabwe .....  |
| .....  | .....  |
| <input checked="" type="checkbox"/> KR Republik Korea .....                    | Kästchen für die Bestimmung von Staaten (für die Zwecke eines nationalen Patents), die dem PCT nach der Veröffentlichung dieses Formblatts beigetreten sind: |
| <input checked="" type="checkbox"/> KZ Kasachstan .....                        | <input checked="" type="checkbox"/> GD Grenada .....   |
| <input checked="" type="checkbox"/> LC Saint Lucia .....                       | <input checked="" type="checkbox"/> IN Indien .....  |
| <input checked="" type="checkbox"/> LK Sri Lanka .....                         | .....  |
| <input checked="" type="checkbox"/> LR Liberia .....                           | .....  |

Erklärung bzgl. vorsorglicher Bestimmungen: Zusätzlich zu den oben genannten Bestimmungen nimmt der Anmelder nach Regel 4.9 Absatz b auch alle anderen nach dem PCT zulässigen Bestimmungen vor mit Ausnahme der im Zusatzfeld genannten Bestimmungen, die von dieser Erklärung ausgenommen sind. Der Anmelder erklärt, daß diese zusätzlichen Bestimmungen unter dem Vorbehalt einer Bestätigung stehen und jede zusätzliche Bestimmung, die vor Ablauf von 15 Monaten ab dem Prioritätsdatum nicht bestätigt wurde, nach Ablauf dieser Frist als vom Anmelder zurückgenommen gilt. (Die Bestätigung einer Bestimmung erfolgt durch die Einreichung einer Mitteilung, in der diese Bestimmung angegeben wird, und die Zahlung der Bestimmungs- und der Bestätigungsgebühr. Die Bestätigung muß beim Anmeldeamt innerhalb der Frist von 15 Monaten eingehen.)



Zusatzfeld Wird dieses Zusatzfeld benutzt, so sollte dieses Blatt dem Antrag nicht beigefügt werden.

1. Wenn der Platz in einem Feld nicht für alle Angaben ausreicht: In diesem Fall schreiben Sie "Fortsetzung von Feld Nr. ..." [Nummer des Feldes angeben] und machen die Angaben entsprechend der in dem Feld, in dem der Platz nicht ausreicht, vorgeschriebenen Art und Weise, insbesondere:
- (i) Wenn mehr als zwei Anmelder und/oder Erfinder vorhanden sind und kein "Fortsetzungsblatt" zur Verfügung steht: In diesem Fall schreiben Sie "Fortsetzung von Feld Nr. III" und machen für jede weitere Person die in Feld Nr. III vorgeschriebenen Angaben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.
  - (ii) Wenn in Feld Nr. II oder III die Angabe "die im Zusatzfeld angegebenen Staaten" angekreuzt ist: In diesem Fall schreiben Sie "Fortsetzung von Feld Nr. II", "Fortsetzung von Feld Nr. III" bzw. "Fortsetzung von Feld Nr. II und Nr. III" und geben den Namen des Anmelders oder die Namen der Anmelder an und neben jedem Namen den Staat oder die Staaten (und/oder ggf. ARIPO-, eurasisches, europäisches oder OAPI-Parent), für die die bezeichnete Person Anmelder ist.
  - (iii) Wenn der in Feld Nr. II oder III genannte Erfinder oder Erfinder/Anmelder nicht für alle Bestimmungsstaaten oder für die Vereinigten Staaten von Amerika als Erfinder benannt ist: In diesem Fall schreiben Sie "Fortsetzung von Feld Nr. II", "Fortsetzung von Feld Nr. III" bzw. "Fortsetzung von Feld Nr. II und Nr. III" und geben den Namen des Erfinders oder die Namen der Erfinder an und neben jedem Namen den Staat oder die Staaten (und/oder ggf. ARIPO-, eurasisches, europäisches oder OAPI-Parent), für die die bezeichnete Person Erfinder ist.
  - (iv) Wenn zusätzlich zu dem Anwalt oder den Anwälten, die in Feld Nr. IV angegeben sind, weitere Anwälte bestellt sind: In diesem Fall schreiben Sie "Fortsetzung von Feld Nr. IV" und machen für jeden weiteren Anwalt die entsprechenden, in Feld Nr. IV vorgeschriebenen Angaben.
  - (v) Wenn in Feld Nr. V bei einem Staat (oder bei OAPI) die Angabe "Zusatzpatent" oder "Zusatzzertifikat" oder wenn in Feld Nr. V bei den Vereinigten Staaten von Amerika die Angabe "Fortsetzung" oder "Teilfortsetzung" hinzugefügt wird: In diesem Fall schreiben Sie "Fortsetzung von Feld Nr. V" und geben den Namen des betreffenden Staats (oder OAPI) an und nach dem Namen jedes solchen Staats (oder OAPI) das Aktenzeichen des Hauptschutzrechts oder der Hauptschutzrechtsanmeldung und das Datum der Erteilung des Hauptschutzrechts oder der Einreichung der Hauptschutzrechtsanmeldung.
  - (vi) Wenn in Feld Nr. VI die Priorität von mehr als drei früheren Anmeldungen beansprucht wird: In diesem Fall schreiben Sie "Fortsetzung von Feld Nr. VI" und machen für jede weitere frühere Anmeldung die entsprechenden, in Feld Nr. VI vorgeschriebenen Angaben.
  - (vii) Wenn in Feld Nr. VI die frühere Anmeldung eine ARIPO Anmeldung ist: In diesem Fall schreiben Sie "Fortsetzung von Feld Nr. VI" und geben, unter Angabe der Nummer der Zeile, in der die die frühere Anmeldung betreffenden Angaben gemacht sind, mindestens einen Staat an, der Mitglied der Pariser Verbandsübereinkunft zum Schutz des gewerblichen Eigentums ist und für den die frühere Anmeldung erfolgte.
2. Wenn, im Hinblick auf die Erklärung bzgl. vorsorglicher Bestimmungen in Feld Nr. V, der Anmelder Staaten von dieser Erklärung ausnehmen möchte: In diesem Fall schreiben Sie "Bestimmung(en), die von der Erklärung bzgl. vorsorglicher Bestimmungen ausgenommen ist(sind)" und geben den Namen oder den Zweibuchstaben-Code jedes so ausgeschlossenen Staates an.
3. Wenn der Anmelder für irgendein Bestimmungsamt die Vorteile nationaler Vorschriften betreffend unschädliche Offenbarung oder Ausnahmen von der Neuheitsschädlichkeit in Anspruch nimmt: In diesem Fall schreiben Sie "Erklärung betreffend unschädliche Offenbarung oder Ausnahmen von der Neuheitsschädlichkeit" und geben im folgenden die entsprechende Erklärung ab.

Fortsetzung zu Feld Nr. IV:

Weitere Vertreter:

Winter, Konrad T.  
Brandl, Ferdinand A.  
Furniss, Peter  
Röss, Walter J.

Polte, Willi M.  
Hübner, Helmut E.  
Weinhold, Peter  
Kaiser, Jürgen  
Stoppkotte, Cornelia  
Witz, Michael  
Alois-Steinecker-Str. 22  
D-85354 Freising

|  |                                     |  |                                     |                                      |
|--|-------------------------------------|--|-------------------------------------|--------------------------------------|
| Feld Nr. VI PRIORITY PRUCH                           |                                     | <input type="checkbox"/> Weitere Ansprüche sind im Zusatzfeld angegeben. |                                     |                                      |
| Anmeldedatum der früheren Anmeldung (Tag/Monat/Jahr) | Aktenzeichen der früheren Anmeldung | Ist die frühere Anmeldung eine:  |                                     |                                      |
|  |                                     | nationale Anmeldung: Staat   | regionale Anmeldung: regionales Amt | internationale Anmeldung: Anmeldeamt |
| Zeile (1)<br>18. Februar 1998<br>(18.02.1998)        | 0388/98                             | Schweiz  |                                     |                                      |
| Zeile (2)  |                                     |  |                                     |                                      |
| Zeile (3)  |                                     |  |                                     |                                      |

☐ Das Anmeldeamt wird ersucht, eine beglaubigte Abschrift der oben in der (den) Zeile(n) bezeichneten früheren Anmeldung(en) zu erstellen und dem internationalen Büro zu übermitteln (nur falls die frühere Anmeldung(en) bei dem Amt eingereicht worden ist/sind), das für die Zwecke dieser internationalen Anmeldung Anmeldeamt ist).

\* Falls es sich bei der früheren Anmeldung um eine ARIPO-Anmeldung handelt, so muß in dem Zusatzfeld mindestens ein Staat angegeben werden, der Mitgliedstaat der Pariser Verbandsübereinkunft zum Schutz des gewerblichen Eigentums ist und für den die frühere Anmeldung eingereicht wurde.

## Feld Nr. VII INTERNATIONALE RECHERCHENBEHÖRDE

Wahl der internationalen Recherchenbehörde (ISA) (falls zwei oder mehr als zwei internationale Recherchenbehörden für die Ausführung der internationalen Recherche zuständig sind, geben Sie die von Ihnen gewählte Behörde an; der Zweibuchstaben-Code kann benutzt werden):

Antrag auf Nutzung der Ergebnisse einer früheren Recherche; Bezugnahme auf diese frühere Recherche (falls eine frühere Recherche bei der internationalen Recherchenbehörde beantragt oder von ihr durchgeführt worden ist):

Datum (Tag/Monat/Jahr) Aktenzeichen Staat (oder regionales Amt)

ISA /

## Feld Nr. VIII KONTROLLISTE; EINREICHUNGSSPRACHE

Diese internationale Anmeldung enthält die folgende Anzahl von Blättern:

Antrag : 6  
Beschreibung (ohne Sequenzprotokollteil) : 15  
Ansprüche : 2  
Zusammenfassung : 1  
Zeichnungen : 1  
Sequenzprotokollteil der Beschreibung :  
Blattzahl insgesamt : 25

Dieser internationalen Anmeldung liegen die nachstehend angekreuzten Unterlagen bei:

1. ☒ Blatt für die Gebührenberechnung
2. ☐ Gesonderte unterzeichnete Vollmacht
3. ☐ Kopie der allgemeinen Vollmacht; Aktenzeichen (falls vorhanden):
4. ☐ Begründung für das Fehlen einer Unterschrift
5. ☒ Prioritätsbeleg(e), in Feld Nr. VI durch folgende Zeilennummer gekennzeichnet: (1)
6. ☐ Übersetzung der internationalen Anmeldung in die folgende Sprache:
7. ☒ Gesonderte Angaben zu hinterlegten Mikroorganismen oder anderem biologischen Material
8. ☐ Protokoll der Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenzen in computerlesbarer Form
9. ☐ Sonstige (einzeln auflisten):

Abbildung der Zeichnungen, die mit der Zusammenfassung veröffentlicht werden soll (Nr.): 1

Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht wird: Deutsch

## Feld Nr. IX UNTERSCHRIFT DES ANMELDERS ODER DES ANWALTS

Der Name jeder unterzeichnenden Person ist neben der Unterschrift zu wiederholen, und es ist anzugeben, sofern sich dies nicht eindeutig aus dem Antrag ergibt, in welcher Eigenschaft die Person unterzeichnet.

  
Dr. Wolfgang RITTHALER  
(Zusammenschluß Nr. 5)

Vom Anmeldeamt auszufüllen

|  |   |
|--|---|
| 1. Datum des tatsächlichen Eingangs dieser internationalen Anmeldung:  | 2. Zeichnungen<br><input type="checkbox"/> eingegangen:<br><br><input type="checkbox"/> nicht eingegangen:        |
| 3. Geändertes Eingangsdatum aufgrund nachträglich, jedoch fristgerecht eingegangener Unterlagen oder Zeichnungen zur Vervollständigung dieser internationalen Anmeldung: |   |
| 4. Datum des fristgerechten Eingangs der angeforderten Richtigstellungen nach Artikel 11(2) PCT:   |   |
| 5. Internationale Recherchenbehörde (falls zwei oder mehr zuständig sind): ISA /   | 6. <input type="checkbox"/> Übermittlung des Recherchenexemplars bis zur Zahlung der Recherchegebühr aufgeschoben |

Vom Internationalen Büro auszufüllen

Datum des Eingangs des Aktenexemplars beim Internationalen Büro:

PCT

BLATT FÜR DIE GEBÜHRENBERECHNUNG  
Anhang zum Antrag

Von Anmeldeamt auszufüllen

Internationales Aktenzeichen

Eingangsstempel des Anmeldeamts

Aktenzeichen des Anmelders  
oder Anwalts L07839

Anmelder

LONZA AG

BERECHNUNG DER VORGESCHRIEBENEN GEBÜHREN

1. ÜBERMITTLUNGSGEBÜHR . . . . . 200,00 T

2. RECHERCHENGEBÜHR . . . . . 2.200,00 S

Die internationale Recherche ist durchzuführen von  
(Sind zwei oder mehr Internationale Recherchenbehörden für die internationale Recherche zuständig,  
ist der Name der Behörde anzugeben, die die internationale Recherche durchführen soll.)

3. INTERNATIONALE GEBÜHR

Grundgebühr

Die internationale Anmeldung enthält 26 Blätter.

umfaßt die ersten 30 Blätter . . . . . 800,00 b1

\_\_\_\_\_ x \_\_\_\_\_ = \_\_\_\_\_ b2

Anzahl der Blätter Zusatzblattgebühr  
über 30

Addieren Sie die in Feld b1 und b2 eingetragenen  
Beträge, und tragen Sie die Summe in Feld B ein . . . . . 800,00 B

Bestimmungsgebühren

Die internationale Anmeldung enthält 10 Bestimmungen.

10 x 184,00 = 1.840,00 D

Anzahl der zu zahlenden

Bestimmungsgebühr

Bestimmungsgebühren (maximal 11)

Addieren Sie die in Feld B und D eingetragenen  
Beträge, und tragen Sie die Summe in Feld I ein . . . . . 2.640,00 I

(Anmelder aus einigen Staaten haben Anspruch auf eine Ermäßigung der internationalen Gebühr um 75%.  
Hat der Anmelder (oder haben alle Anmelder) einen solchen Anspruch, so beträgt der in Feld I einzutragende  
Gesamtbetrag 25% der Summe der in Feld B und D eingetragenen Beträge.)

4. GEBÜHR FÜR PRIORITÄTSBELEG (ggf.) . . . . . P

5. GESAMTBETRAG DER ZU ZAHLENDEN GEBÜHREN

Addieren Sie die in Feldern T, S, I und P eingetragenen Beträge,  
und tragen Sie die Summe in das nebenstehende Feld ein . . . . . 5.040,00  
INSGESAMT

☐ Die Bestimmungsgebühren werden jetzt noch nicht gezahlt.

ZAHLUNGSWEISE

☒ Abbuchungsauftrag (siehe unten)

☐ Bankwechsel

☐ Kupons

☐ Scheck

☐ Barzahlung

☐ Sonstige (einzeln angeben):

☐ Postanweisung

☐ Gebührenmarken

ABBUCHUNGSauftrag (diese Zahlungsweise gibt es nicht bei allen Anmeldeämtern)

Das Anmeldeamt/ EPA ☒ wird beauftragt, den vorstehend angegebenen Gesamtbetrag der Gebühren von meinem laufenden Konto abzubuchen.

☒ wird beauftragt, Fehlbeträge oder Überzahlungen des vorstehend angegebenen Gesamtbetrags der Gebühren meinem laufenden Konto zu belasten bzw. gutzuschreiben.

☐ wird beauftragt, die Gebühr für die Ausstellung des Prioritätsbelegs und seine Übermittlung an das Internationale Büro der WIPO von meinem laufenden Konto abzubuchen.

2800.0049

18. Februar 1999

Kontonummer

Datum (Tag/Monat/Jahr)

Unterschrift Dr. Wolfgang Ritthaler

Applicant's or agent's  
file reference

L07839 L.P.1778

International application No.

INDICATIONS RELATING TO DEPOSITED MICROORGANISM  
OR OTHER BIOLOGICAL MATERIAL

(PCT Rule 13bis)

|   |  |
|---|--|
| A. The indications made below relate to the deposited microorganism or other biological material referred to in the description on page <u>7</u> . line <u>8 - 13</u>   |  |
| B. IDENTIFICATION OF DEPOSIT <span style="float: right;">Further deposits are identified on an additional sheet <input type="checkbox"/></span>   |  |
| Name of depositary institution<br>Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ)  |  |
| Address of depositary institution (including postal code and country)<br>Mascheroderweg 1b<br>38124 Braunschweig<br>Deutschland   |  |
| Date of deposit<br>16. 12.1997 (16. Dezember 1997)  | Accession Number<br>DSM 11902  |
| C. ADDITIONAL INDICATIONS (leave blank if not applicable) <span style="float: right;">This information is continued on an additional sheet <input type="checkbox"/></span>  |  |
| Der in Regel 28 EPÜ vorgesehene Zugang zu dem hinterlegten biologischen Material soll bis zu dem Tag, an dem der Hinweis auf die Erteilung des europäischen Patents bekannt gemacht wird oder an dem die Patentanmeldung zurückgewiesen oder zurückgenommen wird oder als zurückgenommen gilt, nur durch Herausgabe einer Probe an einen Sachverständigen hergestellt werden (Regel 28(4) EPÜ). |  |
| D. DESIGNATED STATES FOR WHICH INDICATIONS ARE MADE (if the indications are not for all designated States)  |  |
| EP  |  |
| E. SEPARATE FURNISHING OF INDICATIONS (leave blank if not applicable)   |  |
| The indications listed below will be submitted to the International Bureau later (specify the general nature of the indications e.g., "Accession Number of Deposit")  |  |
| <div style="text-align: center;">For receiving Office use only</div> <div><input type="checkbox"/> This sheet was received with the international application</div> <div>Authorized officer</div>   | <div style="text-align: center;">For International Bureau use only</div> <div><input type="checkbox"/> This sheet was received by the International Bureau on:</div> <div>Authorized officer</div> |

Applicant's or agent's  
file reference

L07839 L.P.1778

International application No.

INDICATIONS RELATING TO DEPOSITED MICROORGANISM  
OR OTHER BIOLOGICAL MATERIAL

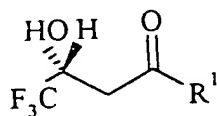
(PCT Rule 13bis)

|   |  |
|---|--|
| A. The indications made below relate to the deposited microorganism or other biological material referred to in the description on page <u>7</u> . line <u>13 - 15</u>  |  |
| B. IDENTIFICATION OF DEPOSIT Further deposits are identified on an additional sheet <input type="checkbox"/>  |  |
| Name of depositary institution<br>Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ)  |  |
| Address of depositary institution (including postal code and country)<br>Mascheroderweg 1b<br>38124 Braunschweig<br>Deutschland   |  |
| Date of deposit<br>07.12.1998 (7. Dezember 1998)  | Accession Number<br>DSM 12566  |
| C. ADDITIONAL INDICATIONS (leave blank if not applicable) This information is continued on an additional sheet <input type="checkbox"/>   |  |
| Der in Regel 28 EPÜ vorgesehene Zugang zu dem hinterlegten biologischen Material soll bis zu dem Tag, an dem der Hinweis auf die Erteilung des europäischen Patents bekannt gemacht wird oder an dem die Patentanmeldung zurückgewiesen oder zurückgenommen wird oder als zurückgenommen gilt, nur durch Herausgabe einer Probe an einen Sachverständigen hergestellt werden (Regel 28(4) EPÜ). |  |
| D. DESIGNATED STATES FOR WHICH INDICATIONS ARE MADE (if the indications are not for all designated States)  |  |
| EP  |  |
| E. SEPARATE FURNISHING OF INDICATIONS (leave blank if not applicable)   |  |
| The indications listed below will be submitted to the International Bureau later (specify the general nature of the indications e.g., "Accession Number of Deposit")  |  |
|   |  |
| For receiving Office use only   | For International Bureau use only  |
| <input type="checkbox"/> This sheet was received with the international application   | <input type="checkbox"/> This sheet was received by the International Bureau on: |
| Authorized officer  | Authorized officer:  |

# Verfahren zur Herstellung von Trifluor-3(R)-hydroxybuttersäurederivaten

Die Erfindung betrifft ein neues biotechnologisches Verfahren zur Herstellung von Trifluor-3(R)-hydroxybuttersäurederivaten der allgemeinen Formel

5



I

10 Trifluor-3(R)-hydroxybuttersäurederivate wie 4,4,4-Trifluor-3(R)-hydroxybuttersäureethylester sind wichtige Zwischenprodukte zur Herstellung von Pharmazeutika wie beispielsweise zur Herstellung von Befloxatone, einem Monoaminoxidase-A-Inhibitor (EP-A-0 736 606).

Zur Herstellung von 4,4,4-Trifluor-3(R)-hydroxybuttersäureester sind bereits mehrere biotechnologisches Verfahren bekannt.

15 Guerrero, A. & Raja, E. (Bioorganic Chemistry Letters 1(12), 675 – 678) beschreiben ein mikrobiologisches Verfahren zur Herstellung von 4,4,4-Trifluor-3(R)-hydroxybuttersäureethylester ausgehend von dem entsprechenden Racemat mittels *Saccharomyces cerevisiae*. Dabei wird das gewünschte Produkt in schlechter Enantiomeren-Reinheit erhalten.

20 Die EP-A-0 736 606 beschreibt ein biotechnologisches Verfahren zur Herstellung von 4,4,4-Trifluor-3(R)-hydroxybuttersäureethylester, ausgehend von 4,4,4-Trifluor-3-hydroxybuttersäureethylester mittels der Lipase Novozym 435. Nachteilig bei diesem Verfahren ist die mässige Ausbeute an dem gewünschten Produkt.

25 Die EP-A-0 577 446 umfasst ein biotechnologisches Verfahren zur Herstellung von optisch aktivem 4,4,4-Trifluor-3-hydroxybuttersäureethylester, ausgehend von dem entsprechenden racemischen Ester mittels Lipasen. Nach diesem Verfahren wird das Produkt in geringer Ausbeute und in schlechter optischer Reinheit erhalten.

30 Die WO 89/02 470 beschreibt ein Verfahren zur Herstellung von 4,4,4-Trifluor-3(R)-hydroxybuttersäureethylester, ausgehend von racemischem 4,4,4-Trifluor-3-acyloxy-

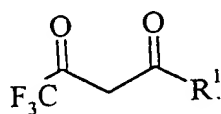
buttersäureethylester mittels hydrolytischen Enzymen. Dabei wird jedoch das entsprechende Produkt nicht in enantiomerenreiner Form erhalten.

5 Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es, ein biotechnologisches Verfahren zur Herstellung von 4,4,4-Trifluor-3(R)-hydroxybuttersäurederivaten zur Verfügung zu stellen, mit welchem das gewünschte Produkt in guter optischer Reinheit und mit guter Ausbeute isoliert werden kann.

Diese Aufgabe wird mit dem Verfahren nach Anspruch 1 gelöst.

10

Erfindungsgemäss wird das Verfahren derart durchgeführt, dass man ein Trifluoracetessigsäurederivat der allgemeinen Formel



II

15

worin

$\text{R}^1$   $-\text{OR}^2$ , worin  $\text{R}^2$  Wasserstoff,  $\text{C}_{1-10}$ -Alkyl,  $\text{C}_{1-10}$ -Alkenyl,  $\text{C}_{3-8}$ -Cycloalkyl, Aryl, Alkoxyalkyl oder Alkoxyalkoxyalkyl ist,

$-\text{NR}^3\text{R}^4$ , worin  $\text{R}^3$  und  $\text{R}^4$  gleich oder verschieden sind und für Wasserstoff,  $\text{C}_{1-10}$ -Alkyl,

$\text{C}_{1-10}$ -Alkenyl,  $\text{C}_{3-8}$ -Cycloalkyl oder Aryl stehen, oder

$-\text{SR}^5$ , worin  $\text{R}^5$  Wasserstoff,  $\text{C}_{1-10}$ -Alkyl,  $\text{C}_{1-10}$ -Alkenyl, Aryl oder  $\text{C}_{3-8}$ -Cycloalkyl ist,

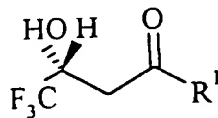
bedeutet,

20

mittels Mikroorganismen, die befähigt sind eine Carbonylfunktion zu reduzieren oder mittels

25

einem zellfreien Enzymextrakt dieser Mikroorganismen, in die Verbindung der allgemeinen Formel



I

worin  $R^1$  die genannte Bedeutung hat, überführt.

Als  $C_{1-10}$ -Alkyl kann im folgenden eine verzweigte oder unverzweigte primäre, sekundäre oder  
 5 tertiäre aliphatische Gruppe wie Methyl, Ethyl, Propyl, Isopropyl, Butyl, Isobutyl, sec-Butyl,  
 tert-Butyl, Pentyl, Isopentyl, sec-Pentyl, Hexyl, Heptyl, Octyl, Nonyl oder Decyl verwendet  
 werden. Vorzugsweise bedeutet  $C_{1-10}$ -Alkyl, Ethyl, Propyl, Isopropyl oder Hexyl.

Als  $C_{1-10}$ -Alkenyl können beispielsweise Ethenyl, Propenyl, Allyl und Butenyl verwendet  
 10 werden. Vorzugsweise wird Allyl verwendet.

Aryl bedeutet bevorzugt substituiertes oder unsubstituiertes Benzyl, Phenyl oder Naphtyl. Als  
 substituiertes Benzyl kann beispielsweise halogeniertes Benzyl wie Chlor- oder Brombenzyl  
 verwendet werden. Vorzugsweise wird unsubstituiertes Benzyl eingesetzt.

5  $C_{3-8}$ -Cycloalkyl bedeutet bevorzugt Cyclopropyl, Cyclobutyl, Cyclopentyl, Cyclohexyl,  
 Cycloheptyl oder Cyclooctyl, vorzugsweise Cyclohexyl.

Alkoxyalkyl bedeutet bevorzugt  $C_{1-6}$ -Alkoxyethyl wie Methoxyethyl und Ethoxyethyl,  
 20 besonders bevorzugt Ethoxyethyl.

Alkoxyalkoxyalkyl bedeutet bevorzugt 2-(2- $C_{1-6}$ -Alkoxy-ethoxy)-ethyl wie 2-(2-Methoxy-  
 ethoxy)-ethyl und 2-(2-Ethoxy-ethoxy)ethyl, wobei letzteres besonders bevorzugt eingesetzt  
 wird.

25 Bevorzugte Edukte sind demnach Trifluoracetessigsäureethyl-, Trifluoracetessigsäurepropyl-,  
 Trifluoracetessigsäureisopropyl- und Trifluoracetessigsäurehexylester, Trifluoracetessigsäure-  
 cyclohexylester, Trifluoracetessigsäurebenzylester, Trifluoracetessigsäureethoxyethylester, und  
 Trifluoracetessigsäureethoxyethoxyethylester.

30 Zweckmäßige Mikroorganismen, die befähigt sind, eine Carbonylfunktion zu reduzieren, sind  
 beispielsweise Mikroorganismen, die ein exprimierbares Gen für ein Enzym enthalten, das



- befähigt ist eine Carbonylfunktion zu reduzieren, beispielsweise ein Enzym mit Reduktase-Aktivität, insbesondere ein Gen für eine Aldehydreduktase, eine Alkoholdehydrogenase oder eine Ketonreduktase. Die Enzyme, die befähigt sind, eine Carbonylfunktion zu reduzieren, können NADPH ( $\beta$ -Nikotinsäureamid-adenindinucleotidphosphat)-abhängig oder von anderen
- 5 Cofaktoren abhängig sein. Vorzugsweise kommen Mikroorganismen mit NADPH-abhängigen Reduktionssystemen zum Einsatz.

- Zellfreie Enzymextrakte dieser Mikroorganismen können durch fachmännisch übliche Methoden, beispielsweise durch French-Press-, Ultraschall- oder Lysozym-Methode, erhalten
- 10 werden.

Zweckmässig wird die Biotransformation mittels Mikroorganismen durchgeführt, die eine Aldehydreduktase, insbesondere eine NADPH-abhängige Aldehydreduktase, enthalten.

- 15 Mikroorganismen, die eine NADPH-abhängige Aldehydreduktase enthalten, wie Mikroorganismen der Spezies *Sporobolomyces salmonicolor*, sind bereits von Shimizu et al., 1990, *Applied and Environmental Microbiology*, 56(8), 2374 - 2377 und Kataoka, M. et al., *Biochimica et Biophysica Acta*, 1122, 57-62 (1992), beschrieben. Diese Mikroorganismen können zum einen selbst für das erfindungsgemässe Verfahren eingesetzt werden, zum anderen
- 20 als Ausgangsmaterial für die Konstruktion von Plasmiden und weiteren geeigneten Mikroorganismen dienen.

- Zweckmässig werden für die Biotransformation rekombinante Mikroorganismen eingesetzt, die mit einem Gen codierend für ein Enzym, das befähigt ist eine Carbonylfunktion zu reduzieren,
- 25 transformiert sind. Mikroorganismen, die mit einem solchen Gen transformiert sein können, sind beispielsweise Mikroorganismen der Gattung *Escherichia*, insbesondere der Spezies *Escherichia coli*, beispielsweise *Escherichia coli* JM109, *Escherichia coli* DH5 und *Escherichia coli* HB101.

- 30 Bevorzugt befindet sich das Gen mit der Reduktase-Aktivität, beispielsweise eine Aldehydreduktase, auf einem zur Transformation geeigneten Vektor, beispielsweise einem Plasmid,
-

zweckmäßig zusammen mit einem zur Expression des Gens geeigneten Promotor wie dem tac-Promotor ( $P_{lac}$ ).

5 Sofern die verwendeten Mikroorganismen NADPH-abhängige Enzyme enthalten, wird die Biotransformation zweckmäßig in Gegenwart von NADPH durchgeführt. Das NADPH wird entweder direkt in den erforderlichen Mengen zugesetzt oder in situ hergestellt. Vorteilhaft wird das NADPH in situ hergestellt. Zu diesem Zweck wird die Biotransformation zweckmäßig in Gegenwart eines NADPH-Generators oder Regenerators durchgeführt, d.h. eines Enzyms, das die Bildung von NADPH aus dessen oxidierten Form,  $NADP^+$ , katalysiert.

10 Zweckmäßig wird als NADPH-Generator oder -Regenerator eine Glucosedehydrogenase eingesetzt, beispielsweise Glucosedehydrogenase aus *Bacillus megaterium*.

Zur Generation von NADPH bei der Biotransformation wird diese zweckmäßig in Gegenwart eines Mikroorganismus durchgeführt, der den NADPH-Generator exprimiert. Insbesondere werden hierzu rekombinante Mikroorganismen verwendet, die mit dem für den NADPH-Generator codierenden Gen transformiert sind. Das Gen für den NADPH-Generator befindet sich hierbei bevorzugt auf einem zur Transformation geeigneten Vektor, beispielsweise einem Plasmid, zweckmäßig zusammen mit einem zur Expression des Gens geeigneten Promotor wie dem tac-Promotor ( $P_{lac}$ ).

20 Für die Herstellung der Trifluor-3(R)-hydroxybuttersäurederivate der allgemeinen Formel I mit einem ein zur Reduktion einer Carbonylfunktion befähigten, NADPH-abhängigen Enzym, beispielsweise eine NADPH-abhängige Aldehyd-Reduktase, enthaltenden Mikroorganismus in Gegenwart eines NADPH-Generators können verschiedene Mikroorganismen eingesetzt werden, von denen einer zur Reduktion der Carbonylfunktion und einer zur Bildung von NADPH befähigt ist. Vorteilhaft enthalten die erfindungsgemäß verwendeten, zur Reduktion einer Carbonylfunktion befähigten Mikroorganismen aber bereits selbst ein für einen NADPH-Generator oder -Regenerator codierendes Gen, beispielsweise ein Gen codierend für eine Glucosedehydrogenase.

30 Vorteilhaft werden für die Biotransformation rekombinante Mikroorganismen eingesetzt, die mit einem für ein NADPH-abhängiges Enzym, beispielsweise einem für eine NADPH-

---

abhängige Aldehydreduktase codierenden Gen, und einem für einen NADPH-Generator oder -Regenerator, beispielsweise einem für eine Glucosedehydrogenase codierenden Gen, transformiert sind. In einer möglichen Ausführungsform befinden sich diese Gene zur Expression auf einem einzigen Plasmid. In einer weiteren Ausführungsform liegen diese Gene auf verschiedenen, miteinander kompatiblen Plasmiden vor.

Die Biotransformation kann also vorteilhaft mittels Mikroorganismen durchgeführt werden, die enthalten:

- mindestens einen Vektor, beispielsweise ein Plasmid, der ein Gen für ein zur Reduktion einer Carbonylfunktion befähigtes Enzym, beispielsweise ein Aldehydreduktase-Gen, enthält;
- mindestens zwei Vektoren, beispielsweise Plasmide, von denen der eine ein Gen für ein zur Reduktion einer Carbonylfunktion befähigtes Enzym, beispielsweise ein Aldehydreduktase-Gen, und der andere ein Gen für einen NADPH-Generator oder -Regenerator, beispielsweise ein Glucosedehydrogenase-Gen; enthält, oder
- mindestens einen Vektor, beispielsweise ein Plasmid, der sowohl ein Gen für ein zur Reduktion einer Carbonylfunktion befähigtes Enzym, beispielsweise ein Aldehydreduktase-Gen, als auch ein Gen für einen NADPH-Generator oder -Regenerator, beispielsweise ein Glucosedehydrogenase-Gen; enthält.

Vorzugsweise wird die Biotransformation mittels Mikroorganismen der Spezies *E. coli* JM109 oder *E. coli* DH5, transformiert mit mindestens zwei Plasmiden enthaltend jeweils ein Aldehydreduktase- oder ein Glucosedehydrogenase-Gen, oder mittels Mikroorganismen der Spezies *E. coli* HB101 oder *E. coli* DH5, transformiert mit mindestens einem Plasmid, welches beide Gene, das Aldehydreduktase- und das Glucosedehydrogenase-Gen enthält, durchgeführt. Insbesondere wird die Biotransformation mit *E. coli* JM109 und *E. coli* DH5, enthaltend ein Aldehydreduktase- und ein Glucosedehydrogenase-Gen, durchgeführt. Selbstverständlich kann die Biotransformation auch mit verschiedenen Mikroorganismen, die jeweils nur eines der genannten Gene enthalten, durchgeführt werden.

30

Fig. 1 zeigt die Struktur eines für die vorliegende Erfindung geeigneten Plasmids, pKAR, das das Gen für die NADPH-abhängige Aldehyd-Reduktase aus *Sporobolomyces salmonicolor*

zusammen mit dem Promotor  $P_{lac}$  und einer Ampicillin (Ap)-Resistenz als Selektionsmarker enthält.

Fig. 2 zeigt die Struktur eines weiteren für die vorliegende Erfindung geeigneten Plasmids, pKKGDH, das das Gen für die Glucosedehydrogenase aus *Bacillus megaterium* zusammen mit dem Promotor  $P_{lac}$  und einer Kanamycin (Km)-Resistenz als Selektionsmarker enthält.

Der Mikroorganismus *E. coli* JM109, enthaltend das Plasmid pKAR mit einem Gen codierend für die NADPH-abhängige Aldehydreduktase aus *Sporobolomyces salmonicolor* und das Plasmid pKKGDH mit einem Gen codierend für die Glucosedehydrogenase aus *Bacillus megaterium*, wurde am 16.12.1997 bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), D-38124 Braunschweig, Mascheroderweg 1b, unter der Bezeichnung DSM 11902 gemäss Budapester Vertrag hinterlegt. Der Mikroorganismen *E. coli* DH5, enthaltend die Plasmide pKAR und pKKGDH, wurde am 7.12.1998 bei der zuvor beschriebenen Hinterlegungsstelle unter der Bezeichnung DSM 12566 gemäss Budapester Vertrag hinterlegt.

Die Expression der Gene kann abhängig vom Expressionssystem erfolgen. Bei den erfindungsgemäss bevorzugten Expressionssystemen kann die Expression der Gene beispielsweise durch IPTG (Isopropylthiogalactosid) induziert werden, wenn als Mikroorganismus *E. coli* JM109 oder *E. coli* HB101 verwendet werden. Bei der Verwendung von *E. coli* DH5 ist die Induktion mit IPTG, wie fachmännisch bekannt, nicht notwendig.

Die Biotransformation kann nach üblichem Anzüchten der Zellen in einem einphasigen oder zweiphasigen System, vorzugsweise in einem zweiphasigen System, durchgeführt werden.

Als einphasiges System können fachmännisch übliche Puffer-Medien wie beispielsweise niedermolare Phosphatpuffer oder Tris-Puffer angewendet werden.

Als zweiphasiges System können die genannten fachmännisch üblichen Puffer-Medien zusammen mit einem für das Edukt löslichen organischen Lösungsmittel verwendet werden. Als organische Lösungsmittel sind beispielsweise Ester, Alkohole, halogenierte Kohlenwas-

serstoffe, Ether, aliphatische C<sub>5-12</sub>-Kohlenwasserstoffe oder aromatische Kohlenwasserstoffe geeignet. Als Ester können Essigsäureester wie Essigsäuremethyl-, Essigsäureethyl-, Essigsäurepropyl- und Essigsäurebutylester verwendet werden. Als Alkohole können C<sub>4-10</sub>-Alkohole wie Hexanol, Heptanol und Octanol verwendet werden. Als aromatische Kohlenwasserstoffe können beispielsweise Benzol, Toluol und Xylol verwendet werden. Als halogenierte Kohlenwasserstoffe können beispielsweise Chloroform und Dichlormethan verwendet werden. Als Ether können beispielsweise Diethylether, Tetrahydrofuran, Methyl-tert-butylether und Dibutylether verwendet werden. Als aliphatische C<sub>5-12</sub>-Kohlenwasserstoffe sind beispielsweise Pentan, Hexan, Heptan, Octan, Nonan und Decan geeignet.

10

Geeignet ist ebenfalls ein zweiphasiges System in welchem die zweite Phase aus dem Edukt und / oder aus dem Produkt besteht. Um die Löslichkeit des Eduktes zu erhöhen, können Cosolvenzien eingesetzt werden. Als Cosolvenzien können entweder niedermolekulare aliphatische Alkohole wie beispielsweise Methanol, Ethanol, Propanol, Isopropanol, tert-Butanol oder inerte Lösungsmittel wie beispielsweise Dimethylsulfoxid, Aceton, Acetonitril verwendet werden.

15

Üblicherweise wird die Biotransformation in Gegenwart einer C-Quelle durchgeführt. Als C-Quelle sind beispielsweise Kohlenhydrate wie Glucose, Fructose oder Saccharose und Zuckeralkohole wie Glycerin geeignet.

20

Der pH-Wert der Medien kann in einem Bereich von 5 bis 10, vorzugsweise von 6 bis 8, liegen.

25

Zweckmässig wird die Biotransformation bei einer Temperatur von 5 bis 60 °C, vorzugsweise von 10 bis 40 °C, durchgeführt.

Nach einer Umsetzungszeit von wenigen Minuten bis 50 h, kann dann das gewünschte Produkt in hoher Ausbeute und Enantiomerenreinheit (ee) isoliert werden.

30

## Beispiele

### Beispiel 1

- 5 **Anzucht der Mikroorganismen**  
Zellen von *E. coli* JM109/pKAR,pKKGDH (DSMZ 11902) wurden in einem 20 l Fermenter in 12 l Mineralsalzmedium (Tabelle 1) bei 22 °C angezüchtet. Nach 6 h wurde IPTG hinzugegeben, um die Zellen zu induzieren. Dann wurde Glycerin hinzugegeben und die Zellen bis zu einer optischen Dichte  $OD_{650nm} = 41,8$  innerhalb 52 h angezüchtet. Dann wurden die
- 10 Zellen bei -80 °C aufbewahrt.
-

Tabelle 1

|  |          |
|--|----------|
| Hefeextrakt  | 0,5 g/l  |
| Glycerin   | 30 g/l   |
| $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$         | 0,8 g/l  |
| $\text{CaCl}_2$                                      | 0,16 g/l |
| $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$                         | 2,0 g/l  |
| SLF-Lösung   | 1,0 ml/l |
| Fe-EDTA-Lösung                                       | 1,5 ml/l |
| PPG-2000   |          |
| $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ |          |
| $\text{KH}_2\text{PO}_4$                             | 1,0 g/l  |
| $\text{K}_2\text{HPO}_4$                             | 1,0 g/l  |
| Thiamin  | 10 mg/l  |

**SLF-Lösung:**

|  |          |
|--|----------|
| KOH  | 15,1 g/l |
| $\text{EDTA Na}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$      | 100 g/l  |
| $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$         | 9,0 g/l  |
| $\text{MnCl}_4 \times 4\text{H}_2\text{O}$           | 4,0 g/l  |
| $\text{H}_3\text{BO}_3$                              | 2,7 g/l  |
| $\text{CoCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$           | 1,8 g/l  |
| $\text{CuCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$           | 1,5 g/l  |
| $\text{NiCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$           | 0,18 g/l |
| $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ | 0,27 g/l |

**Fe-EDTA-Lösung:**

|  |        |
|--|--------|
| KOH  | 10 g/L |
| $\text{EDTANa}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ | 50 g/L |
| $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$   | 20 g/l |

---

## Beispiel 2

### Herstellung von 4,4,4-Trifluor-3(R)-hydroxybuttersäureethylester

- 5 a) Zu 800 ml Mineralsalzmedium (Tabelle 1) enthaltend E.coli JM109/ pKAR,pKKGDH bei einer  $OD_{650nm}$  von 7,2 wurden 140 g Glucose und 0,56 g  $NADP^+$  hinzugegeben. 400 ml Butylacetat enthaltend 70 g 4,4,4-Trifluoracetoacetatethylester wurde hinzugefügt und die resultierende Mischung in einen 2 l Fermenter gegeben, bei 400 Upm gerührt und mit Luft (400 ml/min.) begast. Der pH wurde durch Zugabe von 1 M  $Na_2CO_3$  auf 6,0 gehalten.
- 10 Nach 24 h enthielt die organische Phase 48 g 4,4,4-Trifluor-3(R)-hydroxybuttersäureethylester mit einem ee-Wert von >99%, entsprechend einer molaren Ausbeute von 67,8 %.
- 15 b) Zu 800 ml Kaliumphosphatpuffer (100 mM, pH 6,0) enthaltend die Mikroorganismen gemäss Beispiel 1 bei einer  $OD_{650nm}$  von 30,7 wurden 140 g Glucose und 0,56 g  $NADP^+$  hinzugefügt. 400 ml Butylacetat enthaltend 70 g 4,4,4-Trifluoracetoacetatethylester wurden hinzugegeben und die resultierende Mischung in einen Fermenter entsprechend Beispiel 2a eingespeist. Der pH wurde durch Zugabe von 1 M  $Na_2CO_3$  auf pH 6,0 gehalten. Nach 25 h wurden nochmals 10 g 4,4,4-Trifluoracetoacetatethylester hinzugefügt. Nach 45
- 20 h enthielt die organische Phase 49 g 4,4,4-Trifluor-3(R)-hydroxybuttersäureethylester mit einem ee-Wert von > 99 %, entsprechend einer molaren Ausbeute von 60,6 %.
- 25 c) Zu 800 ml Kaliumphosphatpuffer (0,1 M, pH 6,0) enthaltend E. coli JM109/ pKAR,pKKGDH bei einer  $OD_{650}$  von 7,6 wurden 140 g Glucose und 50 mg  $NADP^+$  zugegeben. 400 ml Butylacetat enthaltend 70 g 4,4,4-Trifluoracetoacetatethylester wurden hinzugefügt und die resultierende Mischung in einen 2-l-Fermenter gegeben, mit 400 Upm gerührt und mit Luft (400 ml/min) begast. Der pH wurde durch Zugabe von 1M  $Na_2CO_3$  auf 6,0 gehalten. Weitere 50 mg  $NADP^+$  wurden 5 h nach Start des Fermenters zugegeben. Nach 24 h enthielt die organische Phase 50 g 4,4,4-Trifluor-3(R)-
- 30 hydroxybuttersäureethylester mit einem ee-Wert von >99,8%, entsprechend einer molaren Ausbeute von 71%.



- d) Zu 800 ml Kaliumphosphatpuffer (0,1 M, pH 6,0) enthaltend E. coli DH5/pKAR, pKKGDH bei einer  $OD_{650}$  von 6,5 wurden 140 g Glucose und 50mg  $NADP^+$  zugegeben. 400 ml Butylacetat enthaltend 70 g 4,4,4-Trifluoracetoacetatethylester wurden hinzugefügt und die resultierende Mischung in einen 2-l-Fermenter gegeben, mit 400 Upm gerührt und mit Luft (400 ml/min) begast. Der pH wurde durch Zugabe von 1M  $Na_2CO_3$  auf 6,0 gehalten. Weitere 50 mg  $NADP^+$  wurden jeweils nach 5 h und 26 h zugegeben. Nach 46 h enthielt die organische Phase 35 g 4,4,4-Trifluor-3(R)-hydroxybuttersäureethylester mit einem ee-Wert von 99,7%, entsprechend einer molaren Ausbeute von 51%.

### Beispiel 3

#### Herstellung von 4,4,4-Trifluor-3(R)-hydroxybuttersäureisopropylester

- a) Zu 800 ml Mineralsalzmedium entsprechend Beispiel 1 enthaltend E. coli JM109/pKAR, pKKGDH bei einer  $OD_{650nm}$  von 9,7 wurden 140 g Glucose und 0,56 g  $NADP^+$  hinzugefügt. 400 ml Butylacetat enthaltend 70 g 4,4,4-Trifluoressigsäureisopropylester wurden hinzugegeben und die resultierende Mischung in einem Fermenter entsprechend Beispiel 2 eingespeist. Der pH wurde durch Zugabe von 1 M  $Na_2CO_3$  auf pH 6,0 gehalten. Nach 21 h enthielt die organische Phase 42,2 g (R)-4,4,4-Trifluor-3-hydroxybuttersäureisopropylester mit einem ee-Wert von >99 %, entsprechend einer molaren Ausbeute von 59,7%.
- b) Zu 800 ml Kaliumphosphatpuffer (0,1 M, pH 6,0) enthaltend E. coli DH5/pKAR, pKKGDH bei einer  $OD_{650}$  von 8,5 wurden 140 g Glucose und 50mg  $NADP^+$  zugegeben. 400 ml Butylacetat enthaltend 70 g 4,4,4-Trifluoracetoacetatisopropylester wurden hinzugefügt und die resultierende Mischung in einen 2-l-Fermenter gegeben, mit 400 Upm gerührt und mit Luft (400 ml/min) begast. Der pH wurde durch Zugabe von 1M  $Na_2CO_3$  auf 6,0 gehalten. Weitere 50 mg  $NADP^+$  wurden 5 h nach Start des Fermenters zugegeben. Nach 24 h enthielt die organische Phase 32 g 4,4,4-Trifluor-3(R)-

hydroxybuttersäureisopropylester mit einem ee-Wert von >99,9%, entsprechend einer molaren Ausbeute von 46%.

#### 5 Beispiel 4

##### Herstellung von 4,4,4,-Trifluor-3(R)-hydroxybuttersäurehexylester

Zu 800 ml Kaliumphosphatpuffer (0,1 M, pH 6,0) enthaltend E. coli DH5/ pKAR,pKKGDH  
 10 bei einer OD<sub>650</sub> von 9,5 wurden 140 g Glucose und 50 mg NADP<sup>+</sup> gegeben. 400 ml  
 Butylacetat enthaltend 70 g 4,4,4-Trifluoracetoacetathexylester wurden hinzugefügt und die  
 resultierende Mischung in einen 2-l-Fermenter gegeben, mit 400 Upm gerührt und mit Luft  
 (400 ml/min) begast. Der pH wurde durch Zugabe von 1M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> auf 6,0 gehalten. Weitere  
 50 mg NADP<sup>+</sup> wurden 5 h nach Start des Fermenters zugegeben. Nach 24 h enthielt die  
 15 organische Phase 2 g 4,4,4-Trifluor-3(R)-hydroxybuttersäurehexylester mit einem ee-Wert von  
 >99,9%, entsprechend einer molaren Ausbeute von 3%.

#### 20 Beispiel 5

##### Herstellung von 4,4,4,-Trifluor-3(R)-hydroxybuttersäurecyclohexylester

Zu 800 ml Kaliumphosphatpuffer (0,1 M, pH 6,0) enthaltend E. coli DH5/pKAR,pKKGDH bei  
 einer OD<sub>650</sub> von 8,9 wurden 140 g Glucose und 50 mg NADP<sup>+</sup> zugegeben. 400 ml Butylacetat  
 25 enthaltend 70 g 4,4,4-Trifluoracetoacetatcyclohexylester wurden hinzugefügt und die  
 resultierende Mischung in einen 2-l-Fermenter gegeben, mit 400 Upm gerührt und mit Luft  
 (400 ml/min) begast. Der pH wurde durch Zugabe von 1M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> auf 6,0 gehalten. Weitere  
 50 mg NADP<sup>+</sup> wurden 5 h nach Start des Fermenters zugegeben. Nach 24 h enthielt die  
 organische Phase 16 g 4,4,4-Trifluor-3(R)-hydroxybuttersäurecyclohexylester mit einem ee-  
 30 Wert von >99,9%, entsprechend einer molaren Ausbeute von 23%.

## Beispiel 6

### Herstellung von 4,4,4-Trifluor-3(R)-hydroxybuttersäurebenzylester

- 5 Zu 800 ml Kaliumphosphatpuffer (0,1 M, pH 6,0) enthaltend *E. coli* DH5/pKAR,pKKGDH bei einer  $OD_{650}$  von 9,0 wurden 140 g Glucose und 50 mg  $NADP^+$  zugegeben. 400 ml Butylacetat enthaltend 70 g 4,4,4-Trifluoracetoacetatbenzylester wurden hinzugefügt und die resultierende Mischung in einen 2-l-Fermenter gegeben, mit 400 Upm gerührt und mit Luft (400 ml/min) begast. Der pH wurde durch Zugabe von 1M  $Na_2CO_3$  auf 6,0 gehalten. Weitere 50 mg  $NADP^+$
- 10 wurden 5 h nach Start des Fermenters zugegeben. Nach 24 h enthielt die organische Phase 6 g 4,4,4-Trifluor-3(R)-hydroxybuttersäurebenzylester mit einem ee-Wert von >99,9%, entsprechend einer molaren Ausbeute von 9%.

## 15 Beispiel 7

### Herstellung von 4,4,4-Trifluor-3(R)-hydroxybuttersäure-2-ethoxyethylester

- 20 Zu 600 ml Kaliumphosphatpuffer (0,1 M, pH 6,0) enthaltend *E. coli* DH5/pKAR,pKKGDH bei einer  $OD_{650}$  von 10,2 wurden 105 g Glucose und 37,5mg  $NADP^+$  zugegeben. 300 ml Butylacetat enthaltend 35 g 4,4,4-Trifluoracetoacetatethoxyethylester wurden hinzugefügt und die resultierende Mischung in einen 2-l-Fermenter gegeben, mit 400 Upm gerührt und mit Luft (300 ml/min) begast. Der pH wurde durch Zugabe von 1M  $Na_2CO_3$  auf 6,0 gehalten. Weitere 37,5 mg  $NADP^+$  wurden 5 h nach Start des Fermenters zugegeben. Nach 24 h enthielt die
- 25 organische Phase 4 g 4,4,4-Trifluor-3(R)-hydroxybuttersäureethoxyethylester mit einem ee-Wert von 98,6%, entsprechend einer molaren Ausbeute von 12%.

**Beispiel 8****Herstellung von 4,4,4,-Trifluor-3(R)-hydroxybuttersäure-2-(2-ethoxyethoxy)ethylester**

- 5 Zu 600 ml Kaliumphosphatpuffer (0,1 M, pH 6,0) enthaltend E. coli DH5/pKAR,pKKGDH bei einer  $OD_{650}$  von 10,7 wurden 105 g Glucose und 37,5 mg  $NADP^+$  zugegeben. 300 ml Butylacetat enthaltend 35 g 4,4,4-Trifluoracetoacetatethoxyethoxyethylester wurden hinzugefügt und die resultierende Mischung in einen 2-l-Fermenter gegeben, mit 400 Upm gerührt und mit Luft (300 ml/min) begast. Der pH wurde durch Zugabe von 1M  $Na_2CO_3$  auf
- 10 6,0 gehalten. Weitere 37,5 mg  $NADP^+$  wurden 5 h nach Start des Fermenters zugegeben. Nach 24 h enthielt die organische Phase 5 g 4,4,4-Trifluor-3(R)-hydroxybuttersäureethoxyethoxyethylester mit einem ee-Wert von >99,9%, entsprechend einer molaren Ausbeute von 16%.

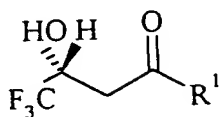
15

**Beispiel 9****Herstellung von 4,4,4,-Trifluor-3(R)-hydroxybuttersäuremethylester**

- 20 Zu 600 ml Kaliumphosphatpuffer (0,1 M, pH 6,0) enthaltend E. coli DH5/pKAR,pKKGDH bei einer  $OD_{650}$  von 11,4 wurden 105 g Glucose und 37,5mg  $NADP^+$  zugegeben. 300 ml Butylacetat enthaltend 33 g 4,4,4-Trifluoracetoacetatmethylester wurden hinzugefügt und die resultierende Mischung in einen 2-l-Fermenter gegeben, mit 400 Upm gerührt und mit Luft (300 ml/min) begast. Der pH wurde durch Zugabe von 1M  $Na_2CO_3$  auf 6,0 gehalten. Weitere
- 25 37,5 mg  $NADP^+$  wurden 5 h nach Start des Fermenters zugegeben. Nach 24 h enthielt die organische Phase 3,6 g 4,4,4-Trifluor-3(R)-hydroxybuttersäuremethylester mit einem ee-Wert von 96,1%, entsprechend einer molaren Ausbeute von 7%.

## Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von Trifluor-3(R)-hydroxybuttersäurederivaten der allgemeinen Formel



I

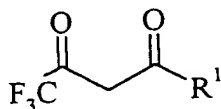
worin

$\text{R}^2$ , worin  $\text{R}^2$  Wasserstoff,  $\text{C}_{1-10}$ -Alkyl,  $\text{C}_{1-10}$ -Alkenyl,  $\text{C}_{3-8}$ -Cycloalkyl, Aryl,

$-\text{NR}^3\text{R}^4$ , worin  $\text{R}^3$  und  $\text{R}^4$  Wasserstoff,  $\text{C}_{1-10}$ -Alkyl,  $\text{C}_{1-10}$ -Alkenyl,  $\text{C}_{3-8}$ -Cycloalkyl oder Aryl stehen, oder

$-\text{SR}^5$ , worin  $\text{R}^5$  Wasserstoff,  $\text{C}_{1-10}$ -Alkyl,  $\text{C}_{1-10}$ -Alkenyl, Aryl oder  $\text{C}_{3-8}$ -Cycloalkyl ist, bedeutet,

umfassend die Umsetzung eines Trifluoracetessigsäurederivats der allgemeinen Formel



II

worin  $\text{R}^1$  die genannte Bedeutung hat, mittels Mikroorganismen, die befähigt sind eine Carbonylfunktion zu reduzieren oder mittels einem zellfreien Enzymextrakt dieser Mikroorganismen.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Biotransformation mittels Mikroorganismen der Gattung *Escherichia* durchgeführt wird, die mit einem Gen transformiert sind, das für ein Enzym codiert, welches befähigt ist, eine Carbonylfunktion zu reduzieren.

3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Biotransformation mittels Mikroorganismen der Spezies *Escherichia coli* JM109, *Escherichia coli* HB 101 oder *Escherichia coli* DH5 durchgeführt wird, die mit einem Gen transformiert sind, das für ein Enzym codiert, welches befähigt ist, eine Carbonylfunktion zu reduzieren.

5

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Biotransformation mittels Mikroorganismen der Spezies *Escherichia coli* JM109, *Escherichia coli* HB101 oder *Escherichia coli* DH5 durchgeführt wird, die mit Genen transformiert sind, die sowohl für ein Enzym, welches befähigt ist, eine Carbonylfunktion zu reduzieren, als auch für eine Glucosedehydrogenase codieren.

10

5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Biotransformation mittels Mikroorganismen der Spezies *Escherichia coli* JM109 oder der Spezies *Escherichia coli* DH5 durchgeführt wird, die mit den Plasmiden pKAR und pKKGDH transformiert sind, wie hinterlegt unter der Hinterlegungsnummer DSM 11902 bzw. DSM 12566.

15

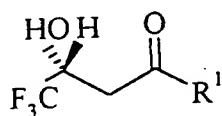
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass die Biotransformation bei einer Temperatur von 5 bis 60°C durchgeführt wird.

- 20 7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass die Biotransformation bei ei ...unrt wird.

## Zusammenfassung

Beschrieben wird ein biotechnologisches Verfahren zur Herstellung von Trifluor-3(R)-hydroxybuttersäurederivaten der allgemeinen Formel

5



I

worin

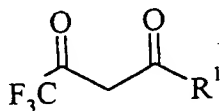
10

$\text{R}^1$   $-\text{OR}^2$ , worin  $\text{R}^2$  Wasserstoff,  $\text{C}_{1-10}$ -Alkyl,  $\text{C}_{1-10}$ -Alkenyl,  $\text{C}_{3-8}$ -Cycloalkyl, Aryl, Alkoxyalkyl oder Alkoxyalkoxyalkyl ist,  
 $-\text{NR}^3\text{R}^4$ , worin  $\text{R}^3$  und  $\text{R}^4$  gleich oder verschieden sind und für Wasserstoff,  $\text{C}_{1-10}$ -Alkyl,  $\text{C}_{1-10}$ -Alkenyl,  $\text{C}_{3-8}$ -Cycloalkyl oder Aryl stehen, oder  
 $-\text{SR}^5$ , worin  $\text{R}^5$  Wasserstoff,  $\text{C}_{1-10}$ -Alkyl,  $\text{C}_{1-10}$ -Alkenyl, Aryl oder  $\text{C}_{3-8}$ -Cycloalkyl ist, bedeutet,

15

ausgehend von ein

allgemeinen Formel



II

20

worin  $\text{R}^1$  die genannte Bedeutung hat, mittels Mikroorganismen, die befähigt sind eine Carbonylfunktion zu reduzieren oder mittels einem zellfreien Enzymextrakt dieser Mikroorganismen.

1/1

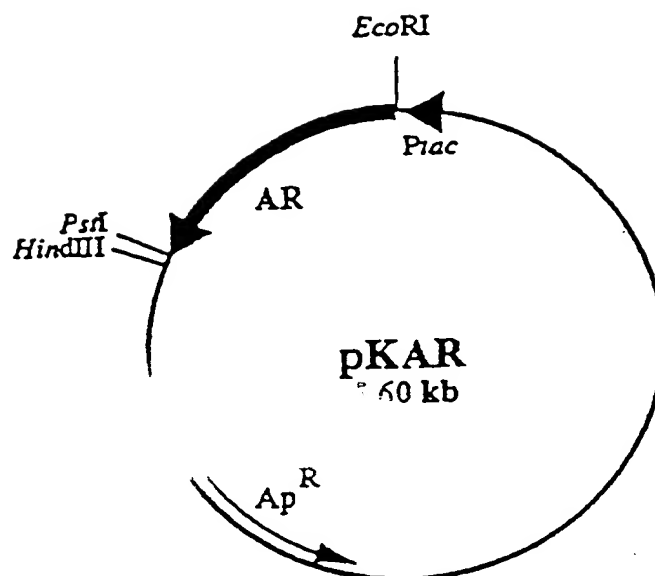


Fig. 1

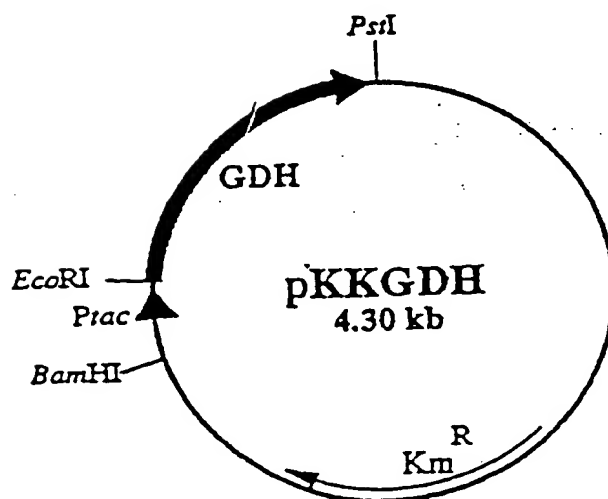


Fig. 2





## 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

|  |  |   |
|--|--|---|
| (51) 国際特許分類 <sup>4</sup><br><b>C12P 7/62, 41/00</b>  | <b>A1</b>  | (11) 国際公開番号<br><b>WO 89/ 02470</b><br><br>(43) 国際公開日<br>1989年3月23日 (23.03.89) |
| (21) 国際出願番号<br>PCT/JP88/00945<br>(22) 国際出願日<br>1988年9月16日 (16. 09. 88)<br>(31) 優先権主張番号<br>特願昭 62-235300<br>特願昭 63-230773<br>(32) 優先日<br>1987年9月18日 (18. 09. 87)<br>1988年9月14日 (14. 09. 88)<br>(33) 優先権主張国<br>JP<br>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について)<br>日本碍子株式会社<br>(NGK INSULATORS, LTD.) (JP/JP)<br>〒467 愛知県名古屋市中区須田町2番56号 Aichi, (JP)<br>(72) 発明者: および<br>(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ)<br>北爪智哉 (KITAZUME, Tomoya) (JP/JP)<br>〒145 東京都大田区北千束三丁目24番1号 大岡山コーポラス115号<br>Tokyo, (JP)<br>(74) 代理人<br>弁理士 杉村茂秀, 外 (SUGIMURA, Akihide et al.)<br>〒100 東京都千代田区霞が関三丁目2番4号 霞山ビルディング<br>Tokyo, (JP)  | (81) 指定国<br>AT (欧州特許), BE (欧州特許), CH (欧州特許), DE (欧州特許),<br>FB (欧州特許), GB (欧州特許), IT (欧州特許), LU (欧州特許),<br>NL (欧州特許), SE (欧州特許), US.<br>添付公開書類<br>国際調査報告書 |   |
| (54) Title: PROCESS FOR SYNTHESIZING OPTICALLY ACTIVE COMPOUNDS<br>(54) 発明の名称 光学活性体の合成法<br><br>(57) Abstract<br><br>A process for synthesizing optically active compounds by asymmetric hydrolysis of a carbinol derivative having a fluorine atom or a fluoroalkyl group using an enzyme as a catalyst, which comprises immobilizing the enzyme on a honey-comb structure of porous ceramics, bringing said carbinol derivative into contact with the immobilized enzyme to conduct asymmetric hydrolysis and, after the reaction has proceeded to a predetermined extent, discontinuing the contact between the enzyme and the carbinol derivatives. |  |   |

(57) 要約

酵素を触媒としてフッ素またはフルオロアルキル基を有するカルビノール誘導体を不斉加水分解して光学活性体を合成するにあたり、前記酵素を多孔質セラミックのハニカム構造体に固定化し、これに前記カルビノール誘導体を接触させて不斉加水分解反応を行い、該反応が所定量進行した後酵素とカルビノール誘導体との接触を解消することにより光学活性体を合成するものである。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第1頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

|    |           |    |             |    |        |
|----|-----------|----|-------------|----|--------|
| AT | オーストリア    | FR | フランス        | MR | モーリタニア |
| AU | オーストラリア   | GA | ガボン         | MY | マラウイ   |
| BB | バルバドス     | GB | イギリス        | NL | オランダ   |
| BE | ベルギー      | HU | ハンガリー       | NO | ノルウェー  |
| BG | ブルガリア     | IT | イタリア        | RO | ルーマニア  |
| BJ | ベナン       | JP | 日本          | SD | スーダン   |
| BR | ブラジル      | KP | 朝鮮民主主義人民共和国 | SE | スウェーデン |
| CF | 中央アフリカ共和国 | KR | 大韓民国        | SN | セネガル   |
| CG | コンゴ       | LI | リヒテンシュタイン   | SU | ソビエト連邦 |
| CH | スイス       | LK | スリランカ       | TD | チャード   |
| CM | カメルーン     | LU | ルクセンブルグ     | TC | タークス   |
| DE | 西ドイツ      | MC | モナコ         | US | 米国     |
| DK | デンマーク     | MG | マダガスカル      |    |        |
| FI | フィンランド    | ML | マリ          |    |        |

## 明 細 書

## 光 学 活 性 体 の 合 成 法

## 技 術 分 野

本発明は強誘電性液晶材料として極めて優れ光学活性体の合成法に関する。

## 背景技術

不斉炭素上にハロゲン、ハロゲノアルキル基を有する光学活性体は強誘電性液晶材料の一種であり、かかる液晶材料は $150\text{nC/cm}^2$ 以上の大きな自発分極を持ち $\mu\text{sec}$ 以下の高速応答性が得られることから、電気光学効果素子、表示デバイスへの実用化が進められている。この種の光学活性体のうち特にフッ素、フルオロアルキル基を有する光学活性体は塩素、臭素等他のハロゲン、ハロゲノアルキル基を有する光学活性体に比して光による液晶物質の分解が少なく長時間に亘って安定した電気光学特性を持続する等特性劣化が極めて少ない特徴を有し、特に優れた液晶材料であることが近年判明した。

フッ素、フルオロアルキル基を有するこの種の光学活性体は非天然物であり、その合成法としては酵素法と非酵素法とが採られるが、酵素法は非酵素法に比して両鏡像体を容易に得られる点で有利である。

ところで、上記したフッ素、フルオロアルキル基を有する光学活性体を酵素法により合成する場合、合成に要する工数の大部分は酵素と未反応物および酵素と反応生成物と

の分離工程によって占められる。かかる合成法における分離手段としてはクロマトグラフィー法が採用される、この分離手段にあっては原理的に上記分離に長時間を要し、かつ1回の分離操作によって得られる反応生成物（光学活性体）の量が極めて少なく、最小の工業的規模とされる数百グラムの光学活性体を得るためにも長時間を要する。また、未反応物と反応生成物との混合比率が所定の値の光学活性体を得るには、極めて複雑な合成操作および分離操作を組み合せかつこれを繰返し行う必要がある。

#### 発明の開示

従って、本発明の目的はこの種の光学活性体を酵素法にて合成する方法において、上記した分離工程における分離操作を容易かつ短時間に行えるようにし、または単独の分離操作それ自体を省略して、合成に要する工数の低減および未反応物と反応生成物との混合比率を所定の値に容易に制御することにある。

本発明は、酵素を触媒としてフッ素またはフルオロアルキル基を有するカルビノール誘導体を不斉加水分解して光学活性体を得る光学活性体の合成法であり、当該合成法は前記酵素を多孔質セラミックのハニカム構造体に固定化して同ハニカム構造体中の酵素と前記カルビノール誘導体とを接触させて前記不斉加水分解反応を行い、反応が所定量進行した後前記ハニカム構造体中の酵素とカルビノール誘導体との接触を解消することを特徴とするものである。

#### 発明を実施するための最良の形態

本発明において用いる酵素は基本的には加水分解酵素で

あり、リパーゼを一例とするエステル類の加水分解酵素である種々のエステラーゼ、セルラーゼを一例とするグリコシドの加水分解酵素である種々のグリコシダーゼ等を用いることができる。また、本発明において用いるカルビノール誘導体はフッ素またはハロゲノアルキル基を有するもの

で、一般式  $\begin{array}{cccc} & \text{OR}_2 & & \text{OR}_2 \\ & | & & | \\ \text{CF}_3 & \text{CHR}_1 & , & \text{CHF}_2 & \text{CHR}_1 & , & \text{CClF}_2 & \text{CHR}_1 & , & \text{CH}_2\text{F} & \text{CHR}_1 \end{array}$  ( $\text{R}_1$ としては直鎖アルキル基、例えば  $n\text{-C}_6\text{H}_{13}$ ,  $n\text{-C}_8\text{H}_{17}$ ; エステル基、例えば  $\text{C}_2\text{H}_5\text{O}(\text{O})\text{CCH}_2$ ; 芳香族基、例えば  $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{CH}_2$  が代表例としてあげられ、 $\text{R}_2$  はアセチル基が好ましい)、 $\text{R}_3\text{O}(\text{O})\text{C}-\text{CF}(\text{R}_4)-\text{C}(\text{O})\text{OR}_3$  ( $\text{R}_3$  はメチル又はエチル基、 $\text{R}_4$  は水素原子、メチル基又はエチル基が好ましい) で表わされる化合物である。具体的には、2-フルオロマロン酸ジメチル、2-フルオロ-2-メチルマロン酸ジエチル、エチル-4、4、4-トリフルオロ-3-ヒドロキシブチレートや  $\text{CF}_3$ ,  $\text{CHF}_2$ ,  $\text{CF}_2\text{Cl}$  等のフルオロアルキル基を有するアセタート誘導体等を用いることができる。

本発明において用いる多孔質セラミックのハニカム構造体としては、固定化すべき酵素、不斉加水分解反応の条件等により適宜の材質、平均細孔径、細孔構造、貫通孔の大きさ、配列のものが用いられ、コーディエライト、ムライト、シリカ、アルミナ、ゼオライト、ジルコニア、チタニア等のセラミック材料にて形成される。

ハニカム構造体の孔形状は三角、四角、六角等の多角形状、円、楕円形状のものであり、その孔相当直径は 1~30 mm のものが好ましい。ハニカム構造体の孔相当直径が 1 mm

未満の場合には酵素の固定が難しく、かつ反応液をハニカム構造体の各貫通孔を流通させる反応手段を採る場合には、圧力損失が大きくなって好ましくない。これとは逆に孔相当直径が30mmを超える場合には、固定化された酵素と反応液との接触効率が低くて反応速度の低下をもたらす。ハニカム構造体の開孔率は50~85%が好ましく、この範囲内においては酵素の固定化が容易でありかつ反応液との接触効率が低い。酵素の固定化後のハニカム構造体においては、固定化された酵素により各貫通孔が埋っていても使用可能であるが、各貫通孔内に反応液が流通する流通路が存在していることが好ましい。この場合の各貫通孔の水力直径は0.5~30mm、開孔率は30~80%であることが好ましく、これらの範囲内において反応液を各貫通孔を流通させる反応手段を採る場合、流通時の圧力損失が小さくかつ接触効率が低い。ハニカム構造体は反応液中の溶媒に対する安定性の点からコーディエライト、ムライト、アルミナ、ゼオライト等のセラミック質のものが好ましく、またゼオライト、 $\gamma$ -アルミナ質等表面電荷を有している場合には、酵素の固定化にイオン結合、共有結合を利用して酵素の固定状態の安定性を高めることができる。ハニカム構造体の気孔率については25~40%が好ましく、気孔率が25%未満の場合には酵素との相互作用が弱く、これとは逆に40%を超えるとハニカム構造体の強度が低下する。

かかるハニカム構造体を固定化する手段としては、包括法、架橋法、共有結合法、イオン結合法、物理吸着法等公知の手段を用いることができる。具体的には、例えば酵素

を付着しやすい物質をハニカム構造体に予め付着してこの物質に酵素を付着する方法、上記物質に予め酵素を混合してこの混合物をハニカム構造体に付着する方法、ハニカム構造体の細孔、貫通孔等空隙に酵素を挿入してその上に上記物質を付着する方法等が好適に採用し得る。また、特に、ハニカム構造体の各貫通孔内に反応液を流通させる反応手段を採る場合には、酵素を各貫通孔内に上記包括法を用いて埋めるように担持させ、その後圧縮空気、振動等により余剰の酵素を除去する手段を採用することもできる。

本発明の加水分解反応において、反応温度は $-20\sim 80^{\circ}\text{C}$ の範囲内において酵素の失活との関連の下で定める。反応液との接触時間は、未反応物と反応生成物との混合比率が所定の値となるように制御する。具体的には、酵素反応により光学活性体を合成する場合、一般的に加水分解率が高くなる程すなわち未反応物と反応生成物との混合比率が反応生成物100%に近づく程光学純度が低下するので、ハニカム構造体の酵素と反応液との接触時間は光学純度が80%以上となる様に加水分解率10~80%の範囲内で定める。この場合の加水分解率は反応液中の(反応生成物)/(未反応物+反応生成物)モル比 $\times 100$ で定義されるが、10%未満であると反応の進行が不十分であり、80%を超えると光学純度が大きく低下する。高い光学純度を維持しながら収率も向上させる為には、加水分解率20~70%が好ましい。ハニカム構造体の各貫通孔内に反応液を流通させる反応手段を採る場合には、反応液の流速が速い方が拡散抵抗が小さくなるため、固定した酵素の脱離が認められない程度に

流速を速くする。尚、流通方式については、ワンパス式、循環式等を適宜選択することができる。

本発明の合成法においては、フッ素またはフルオロアルキル基を有するカルビノール誘導体を不斉加水分解して光学活性体を得るための触媒として、ハニカム構造体に固定化した酵素を用い同ハニカム構造体の酵素とカルビノール誘導体とを接触させて不斉加水分解反応を行っている。このため、反応が所定量進行した後ハニカム構造体中の酵素とカルビノール誘導体との接触を解消するには、同ハニカム構造体を反応系から除去するかまたは反応系から反応生成物および未反応物を除去すればよく、さらにハニカム構造体の各貫通孔内に反応液を流通させる反応手段を採る場合には、特別な手段をもちいることはなく接触を解消することができる。従って、本発明によれば、従来の複雑かつ長時間要していた分離操作を簡単かつ短時間にし、または分離操作自体を省略し得て、これにより合成に要する工数を著しく低減させかつ光学活性体の収量を著しく増大させることができる。また、かかる簡単かつ短時間の接触解消手段により不斉加水分解反応の進行が停止するため、反応系中の未反応物と反応生成物との混合比率を所定の値に極めて容易に調整することができ、これにより所望の光学活性体を容易に得ることができる。

#### (第1実施例)

##### (1) 酵素のハニカム構造体への固定化

ハニカム構造体としてムライト質のセラミックハニカム構造体（外径50mm、長さ10mm、孔形状四角形、孔ピッチ2.8



mm) を用い、酵素を下記の A, B, C の方法により固定化した。

A 法：ナトリウムアルギナート 2.5 g (13mmol) を水 40ml に混合してなる混合液をハニカム構造体の内外に付着し、このハニカム構造体にリパーゼ M Y<sup>\*1</sup> 7.0 g ( $3 \times 10^4$  unit/g) を溶解した CaCl<sub>2</sub> 10% 水溶液を含浸させてリパーゼ M Y を固定化する。

B 法：ナトリウムアルギナート 2.5 g (13mmol)、リパーゼ M Y 7.5 g ( $3 \times 10^4$  unit/g)、水 40ml を混合し、この混合物をハニカム構造体の内外に付着した後 CaCl<sub>2</sub> 10% 水溶液を含浸させて固定化する。

C 法：ナトリウムアルギナート 2.5 g (13mmol) と水 40ml との混合液の半量をハニカム構造体の一端開口部の全面に付着し、同構造体の他端開口部からリパーゼ M Y 7.0 g ( $3 \times 10^4$  unit/g) を各貫通孔内に注入して担持させ、次いで前記混合液の残量を同構造体の他端開口部の全面に付着した後、CaCl<sub>2</sub> 10% 水溶液を含浸させてリパーゼ M Y を封入して固定化する。

なお、これらの方法において、酵素としてリパーゼ M Y に換えてリパーゼ P<sup>\*2</sup>、セルラーゼ<sup>\*3</sup>、リパーゼ M 10<sup>\*4</sup> を用いて、リパーゼ M Y と同量 (unit/g) 固定化させた。

(注) \* 1 : 名糖産業株式会社製酵素の商品名

\* 2 ~ \* 4 : 天野製薬株式会社製酵素の商品名

## (2) 合成例 I

リパーゼ M Y を A 法にて固定化してなるハニカム構造

体を $\text{KH}_2\text{PO}_4$ — $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  緩衝溶液 ( $\text{pH}=7.3$ ) 60ml 中に浸漬し、この溶液に 2-フルオロマロン酸ジメチル 20mmol を加えて 40~41°C で攪拌しつつ 1 時間不斉加水分解した後、前記ハニカム構造体を溶液中から除去した。生成した油状物質をジエチルエーテルで抽出し、溶媒を除去した後減圧蒸留して (—) - 2-フルオロマロン酸モノメチルを収率 67% で得た。その特性は下記の通りである。

bp : 107~109°C / 2 mmHg

$[\alpha]_D^{25}/\text{MeOH}(\text{C}, 1.67) : +3.22, >95\% \text{ ee}$

$^{19}\text{F NMR}(\text{CDCl}_3) : \delta 114.5(\text{d}, J_{\text{F-H}}=48\text{Hz}) \text{ ppm}$

$^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3) : \delta 3.95(\text{CH}_3, \text{S}),$

5.42(1H, d,  $J=48\text{Hz}$ ),

10.22(1H, S)

### (3) 合成例 II

リパーゼ—MY を C 法にて固定化してなるハニカム構造体を合成例 I と同じ緩衝溶液 60ml 中に浸漬し、この溶液に 2-フルオロ-2-メチルマロン酸ジエチル 20mmol を加え、40~41°C で攪拌しつつ 108 時間不斉加水分解した後、前記ハニカム構造体を溶液中から除去した。生成した油状物質を酢酸エチルで抽出し、溶媒を留去した後減圧蒸留して (S) - (—) - 2-フルオロ-2-メチルマロン酸モノエチルを収率 75% で得た。その特性は下記の通りである。

bp : 90~92°C / 0.6 mmHg

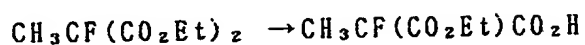
$[\alpha]_D^{25}/\text{MeOH}(\text{C}, 2.81) : -17.0, 86\% \text{ ee}$

$^{19}\text{F NMR}(\text{CDCl}_3) : \delta 77.8(\text{q}, J_{\text{F-Me}}=21.4\text{Hz}) \text{ ppm}$

$^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3) : \delta 1.32(\text{CH}_3, \text{t}, J=7.1\text{Hz}),$   
 $1.77(\text{CH}_3, \text{d}), 4.27(\text{CH}_2, \text{q}),$   
 $10.90(\text{CO}_2\text{H}, \text{s})$

#### (4) 合成例 III

各種の酵素を A, B, C 法にて固定化してなるハニカム構造体を用い、かつ反応時間を除き合成例 II と同じ条件下に示す 2-フルオロ-2-メチルマロン酸ジエチルの不斉加水分解反応を行った。



反応条件を第 1 表に、得られた反応生成物の収率および特性を第 2 表にそれぞれ示す。

第 1 表

| 実験<br>No. | 酵 素      | 固定<br>化法 | 反応時間<br>(hr) |
|-----------|----------|----------|--------------|
| 1         | リパーゼ- MY | A        | 24           |
| 2         | セルラーゼ    | A        | 24           |
| 3         | リパーゼ- MY | B        | 36           |
| 4         | リパーゼ- P  | B        | 42           |
| 5         | リパーゼ- MY | C        | 75           |

第 2 表

| 実験<br>No | 収率<br>(%) | $[\alpha]_D$<br>(MeOH) | 光学純度<br>(%ee) | 絶対<br>構造 |
|----------|-----------|------------------------|---------------|----------|
| 1        | 43        | -18.2                  | 89            | S        |
| 2        | 33        | +6.30                  | 29            | R        |
| 3        | 71        | -17.3                  | 81            | S        |
| 4        | 42        | +6.32                  | 30            | R        |
| 5        | 75        | -17.0                  | 86            | S        |

## (5) 合成例 IV

リパーゼMYをB法にて固定化してなるハニカム構造体を合成例Iと同じ緩衝溶液60ml中に浸漬し、この溶液にエチル-4, 4, 4-トリフルオロ-3-ヒドロキシプラチートのアセタート体20mmolを加え、40~41℃で攪拌しつつ5時間不斉加水分解した後前記ハニカム構造体を溶液中から除去し、ヘキサノ-酢酸エチル(5:1)を溶媒としてカラムクロマトグラフィーにて(R)-(+ )体を分離した。次いで、セルラーゼをB法にて固定してなるハニカム構造体を浸漬してなる上記と同じ緩衝溶液60mmol中に回収したアセタート体を加え、上記と同様に不斉加水分解および分離を行って(S)-(-)体を得た。その特性は下記の通りである。

(R)-(+ )体  $[\alpha]_D$  (neat): +18.7, 88%ee

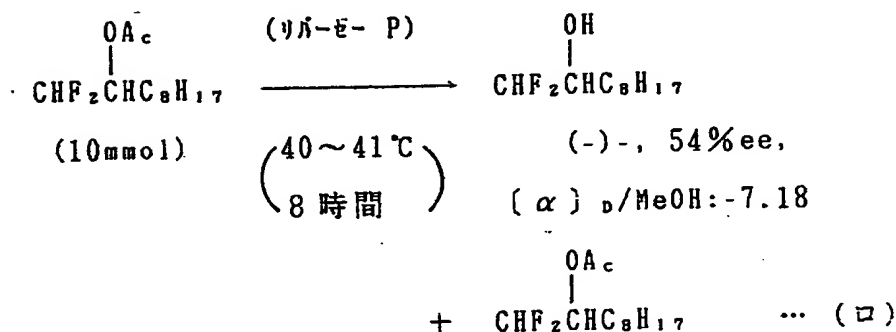
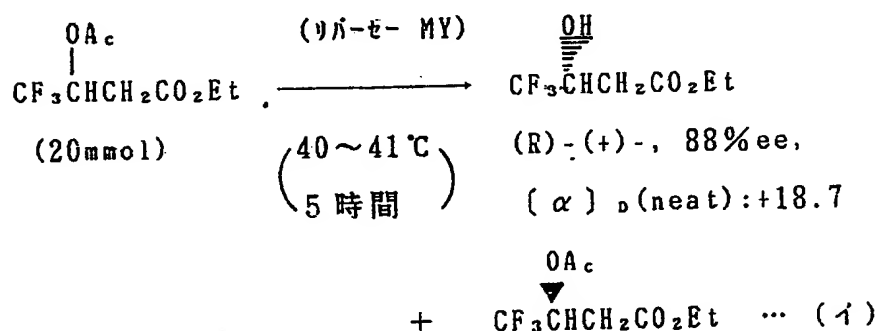
(S)-(-)体  $[\alpha]_D$  (neat): -19.6, 92%ee

$^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  2.6(d,  $J=6.6\text{Hz}$ ) ppm

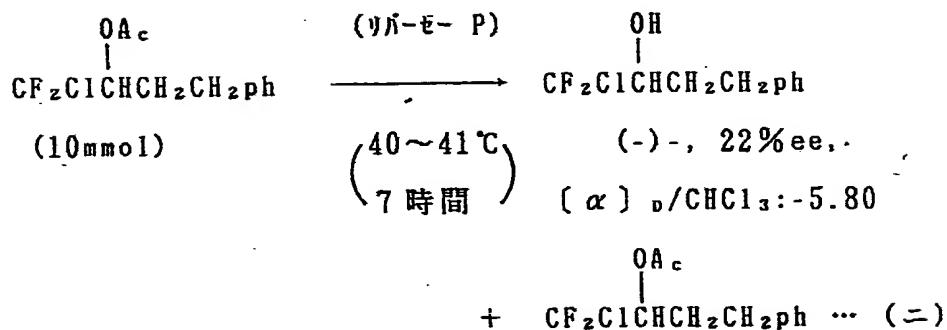
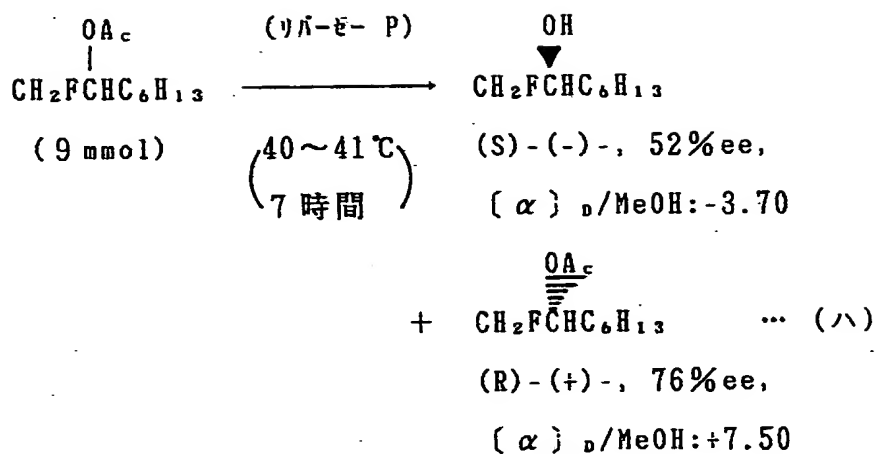
$^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3) : \delta 1.25(\text{CH}_3, \text{t}, J = 7.3\text{Hz}),$   
 $2.62(\text{CH}_2, \text{d}, J = 5.6\text{Hz}),$   
 $4.30 (4 \times \text{H}, \text{m})$

# (6) 合成例 V

リパーゼ-MY, リパーゼ-PをB法にて固定化してなるハニカム構造体を合成例Iと同じ緩衝溶液60ml中に浸漬し、この溶液に各種のアセタート誘導体を加えて下記(イ)～(ニ)式にて示す不斉加水分解反応を行った。反応条件および反応生成物の特性を各式に併せて表記する。



12



## (7) 合成例 VI (比較例)

リパーゼ-MY7.0 g ( $3 \times 10^4$  unit/g) を合成例 I と同じ緩衝溶液 60 ml 中に分散し、この混合液に 2-フルオロマロン酸ジメチル 20 mmol を加えて 40~41℃ で攪拌しつつ 1 時間不斉加水分解反応を行った。反応後、リパーゼ-MY と反応生成物とを分離するためセラハイトによる濾過を行ったが、8 時間の濾過工程を 3 回繰返し行って 24 時間を要した。次いで、生成した油状物質を合成例 I と同様に処理して、(-)-2-フルオロマロン酸モノメチルを収率 74% で得た。その特性は下記の通りである。

bp : 107~109°C / 2 mmHg

$[\alpha]_D^{25}/\text{MeOH}(C, 1.64) : +2.95, 87\% \text{ ee}$

$^{19}\text{F NMR}(\text{CDCl}_3) : \delta 114.5(\text{d}, J=48\text{Hz}) \text{ ppm}$

$^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3) : \delta 3.95(\text{CH}_3, \text{S}),$

5.42(1H, d,  $J=48\text{Hz}$ ),

10.22(1H, S)

#### (8) 合成例 VII (比較例)

リパーゼ-MY 7.0 g ( $3 \times 10^4 \text{ unit/g}$ ) を合成例 II と同じ緩衝溶液 60ml 中に分散し、この混合液に 2-フルオロ-2-メチルマロン酸ジエチル 20mmol を加え、40~41°C で攪拌しつつ 108 時間不斉加水分解反応を行った。反応後、リパーゼ-MY と反応生成物とを分離するためセライトによる濾過を行ったが、8 時間の濾過工程を 3 回繰り返し行って 24 時間を要した。次いで、生成した油状物質を合成例 II と同様に処理して (S) - (-) - 2-フルオロ-2-メチルマロン酸モノエチルを収率 53% で得た。その特性は下記の通りである。

bp : 90~92°C / 0.6 mmHg

$[\alpha]_D^{25}/\text{MeOH}(C, 2.82) : -15.8, 80\% \text{ ee}$

$^{19}\text{F NMR}(\text{CDCl}_3) : \delta 77.8(\text{q}, J_{\text{p-Me}}=21.4\text{Hz}) \text{ ppm}$

$^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3) : \delta 1.32(\text{CH}_3, \text{t}, J=7.1\text{Hz}),$

1.77( $\text{CH}_3, \text{d}$ ), 4.27( $\text{CH}_2, \text{q}$ )

10.90( $\text{CO}_2\text{H}, \text{S}$ )

#### (第 2 実施例)

##### (1) 酵素のハニカム構造体への固定化

ハニカム構造体としてムライト質のセラミックハニカム

構造体（外径50mm、孔形状四角形、孔ピッチ2.8 mm、開孔率75%）を用い、酵素を下記Dの方法により固定化した。

D法：ナトリウムアルギナート3wt%水溶液およびリパーゼMY5wt%懸濁液を体積比9：1に混合し、これを温度37℃に保持してゲル状液とする。このゲル状液内にハニカム構造体（長さ100 mm）を浸漬し、同構造体のセル壁面上にゲル状液を付着させる。次いで、圧縮空気を吹付けて付着膜厚を調整し、これにCaCl<sub>2</sub> 4.5 wt%水溶液を含浸させて固定化する。固定化後の開孔率は40%である。

#### (2)合成例Ⅷ

リパーゼMYをB法にて固定化してなるハニカム構造体をKH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>緩衝溶液（pH=7.3）60ml中に浸漬し、この溶液に2-フルオロ-2-メチルマロン酸ジメチル20mmolを加えて40～41℃で攪拌しつつ36時間不斉加水分解した後、反応生成物を含む溶液をハニカム構造体を含む反応系から抜き出した。生成した油状物質をジエチルエーテルで抽出し、溶媒を除去した後減圧蒸留して光学純度84%の（-）-2-フルオロ-2-メチルマロン酸モノメチルを収率70%で得た。

#### (3)合成例Ⅸ

リパーゼMYをD法にて固定化してなるハニカム構造体を流通系の管型反応器に充填し、5wt%の2-フルオロ-2-メチルマロン酸ジメチルを含むKH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-NaHPO<sub>4</sub>緩衝溶液（pH=7.3）を、ハニカム構造体の各貫通孔内を流通させて不斉加水分解反応を行った。この反応系における温度は40～41℃、流速はLHSV=10/hr、循環方式にて流通液の



酵素との接触時間は24時間である。生成した油状物質をジエチルエーテルで抽出し、溶媒を除去した後減圧蒸留して光学純度85%eeの(−)-2-フルオロ-2-メチルマロン酸モノメチルを収率66%で得た。

なお、本合成例においては、反応液をハニカム構造体の各貫通孔内を流通させる流通系の反応手段を採用しているため、反応液と酵素との接触効率が良くて光学純度の高い光学活性体が高収率で得られるとともに、ハニカム構造体と反応生成物および未反応物との分離手段を省略することができる。

#### 産業上の利用可能性

本発明によれば、強誘電性液晶材料として極めて優れた光学活性体を多孔質セラミッグのハニカム構造体に固定化した酵素による接触反応で容易に合成することができ、これは電気光学効果素子、表示デバイス等の材料として有用である。

## 請 求 の 範 囲

1. 酵素を触媒としてフッ素またはフルオロアルキル基を有するカルビノール誘導体を不斉加水分解して光学活性体を得る光学活性体の合成法であり、当該合成法は前記酵素を多孔質セラミックのハニカム構造体に固定化して同ハニカム構造体中の酵素と前記カルビノール誘導体とを接触させて前記不斉加水分解反応を行い、反応が所定量進行した後前記ハニカム構造体中の酵素とカルビノール誘導体の接触を解消することを特徴とする光学活性体の合成法。
2. 前記カルビノール誘導体の不斉加水分解が加水分解率で10～80%進行した時に前記ハニカム構造体中の酵素とカルビノール誘導体との接触を解消して不斉加水分解反応を停止する請求の範囲第1項記載の光学活性体の合成法。
3. ハニカム構造体を反応系から除去するかまたは反応系から反応生成物および未反応物を除去することにより前記酵素とカルビノール誘導体との接触を解消する請求の範囲第1項記載の光学活性体の合成法。
4. ハニカム構造体の各貫通孔内に反応液を流通させる手段により前記酵素とカルビノール誘導体との接触を解消する請求の範囲第1項記載の光学活性体の合成法。

5. 前記カルピノール誘導体として一般式  $\text{CF}_3\overset{\text{OR}_2}{\underset{|}{\text{CHR}}_1}$ ,

$\text{CHF}_2\overset{\text{OR}_2}{\underset{|}{\text{CHR}}_1}$ ,  $\text{CClF}_2\overset{\text{OR}_2}{\underset{|}{\text{CHR}}_1}$ ,  $\text{CH}_2\text{F}\overset{\text{OR}_2}{\underset{|}{\text{CHR}}_1}$  ( $\text{R}_1$ としては、直鎖アルキル基、エステル基、芳香族化合物基;  $\text{R}_2$ はアセチル基) または  $\text{R}_3\text{O}(\text{O})\text{C}-\text{CF}(\text{R}_4)-\text{C}(\text{O})\text{OR}_3$  ( $\text{R}_3$ は $\text{C}_1\sim\text{C}_8$ のアルキル基;  $\text{R}_4$ は水素原子又は $\text{C}_1\sim\text{C}_8$ のアルキル基) で表わされる化合物を用いることを特徴とする請求の範囲第1項記載の光学活性体の合成法。

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/JP88/00945

| <b>I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> (If several classification symbols apply, indicate all) <sup>6</sup><br>According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC<br><div style="text-align: center; font-family: monospace; font-size: 1.2em;">Int.Cl<sup>4</sup>      C12P7/62, 41/00</div>   |   |                                     |  |  |  |                                 |   |     |   |  |     |
|--|---|-------------------------------------|--|--|--|---------------------------------|---|-----|---|--|-----|
| <b>II. FIELDS SEARCHED</b><br><div style="text-align: center; font-size: 0.8em;">Minimum Documentation Searched <sup>7</sup></div> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 20%; padding: 5px;">Classification System</td> <td style="padding: 5px;">Classification Symbols</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; padding: 10px;">IPC</td> <td style="padding: 10px;">C12P7/62, 41/00, C12N11/14</td> </tr> </table> <div style="text-align: center; font-size: 0.8em; margin-top: 5px;">Documentation Searched other than Minimum Documentation to the extent that such Documents are included in the Fields Searched <sup>8</sup></div>  |   |                                     | Classification System  | Classification Symbols   | IPC  | C12P7/62, 41/00, C12N11/14      |   |     |   |  |     |
| Classification System  | Classification Symbols  |                                     |  |  |  |                                 |   |     |   |  |     |
| IPC  | C12P7/62, 41/00, C12N11/14  |                                     |  |  |  |                                 |   |     |   |  |     |
| Computer search CAS online   |   |                                     |  |  |  |                                 |   |     |   |  |     |
| <b>III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <sup>9</sup></b> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <th style="width: 10%; padding: 5px;">Category <sup>*</sup></th> <th style="width: 70%; padding: 5px;">Citation of Document, <sup>11</sup> with indication, where appropriate, of the relevant passages <sup>12</sup></th> <th style="width: 20%; padding: 5px;">Relevant to Claim No. <sup>13</sup></th> </tr> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 10px;">P</td> <td style="padding: 10px;">           Chemical Abstract, Vol. 109, No. 11, (1988) (Columbus, Ohio, U.S.A.)<br/>           T. Kitazume, N. Okamura, T. Ikeya, T. Yamazaki, "Synthesis of optically active fluorinated materials by use of immobilized enzymes for asymmetric hydrolysis" See, Abstract No. 89261a, J. Fluorine Chem., 1988, 39(1), 107-115 (Eng)         </td> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 10px;">1-4</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 10px;">Y</td> <td style="padding: 10px;">           Chemical Abstract, Vol. 102, No. 9, 4 March 1985 (04. 03. 85) (Columbus, Ohio, U.S.A.)<br/>           T. Kitazume, T. Sato, N. Ishikawa, "Enantioselective synthesis of monofluorinated malonic acid monoesters with enzymes of microbial origin" See, Abstract No. 75208g, Chem. Lett., 1984, (10), 1811-14 (Eng)         </td> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 10px;">1-4</td> </tr> </table> |   |                                     | Category <sup>*</sup>  | Citation of Document, <sup>11</sup> with indication, where appropriate, of the relevant passages <sup>12</sup>   | Relevant to Claim No. <sup>13</sup>  | P                               | Chemical Abstract, Vol. 109, No. 11, (1988) (Columbus, Ohio, U.S.A.)<br>T. Kitazume, N. Okamura, T. Ikeya, T. Yamazaki, "Synthesis of optically active fluorinated materials by use of immobilized enzymes for asymmetric hydrolysis" See, Abstract No. 89261a, J. Fluorine Chem., 1988, 39(1), 107-115 (Eng) | 1-4 | Y | Chemical Abstract, Vol. 102, No. 9, 4 March 1985 (04. 03. 85) (Columbus, Ohio, U.S.A.)<br>T. Kitazume, T. Sato, N. Ishikawa, "Enantioselective synthesis of monofluorinated malonic acid monoesters with enzymes of microbial origin" See, Abstract No. 75208g, Chem. Lett., 1984, (10), 1811-14 (Eng) | 1-4 |
| Category <sup>*</sup>  | Citation of Document, <sup>11</sup> with indication, where appropriate, of the relevant passages <sup>12</sup>  | Relevant to Claim No. <sup>13</sup> |  |  |  |                                 |   |     |   |  |     |
| P  | Chemical Abstract, Vol. 109, No. 11, (1988) (Columbus, Ohio, U.S.A.)<br>T. Kitazume, N. Okamura, T. Ikeya, T. Yamazaki, "Synthesis of optically active fluorinated materials by use of immobilized enzymes for asymmetric hydrolysis" See, Abstract No. 89261a, J. Fluorine Chem., 1988, 39(1), 107-115 (Eng) | 1-4                                 |  |  |  |                                 |   |     |   |  |     |
| Y  | Chemical Abstract, Vol. 102, No. 9, 4 March 1985 (04. 03. 85) (Columbus, Ohio, U.S.A.)<br>T. Kitazume, T. Sato, N. Ishikawa, "Enantioselective synthesis of monofluorinated malonic acid monoesters with enzymes of microbial origin" See, Abstract No. 75208g, Chem. Lett., 1984, (10), 1811-14 (Eng)        | 1-4                                 |  |  |  |                                 |   |     |   |  |     |
| <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p><sup>*</sup> Special categories of cited documents: <sup>10</sup></p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </div> <div style="width: 50%;"> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"Z" document member of the same patent family</p> </div> </div>   |   |                                     |  |  |  |                                 |   |     |   |  |     |
| <b>IV. CERTIFICATION</b> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%; padding: 5px;">           Date of the Actual Completion of the International Search<br/><br/> <div style="text-align: center; font-family: monospace; font-size: 1.1em;">November 16, 1988 (16. 11. 88)</div> </td> <td style="width: 50%; padding: 5px;">           Date of Mailing of this International Search Report<br/><br/> <div style="text-align: center; font-family: monospace; font-size: 1.1em;">November 28, 1988 (28. 11. 88)</div> </td> </tr> <tr> <td style="padding: 5px;">           International Searching Authority<br/><br/> <div style="text-align: center; font-family: monospace; font-size: 1.1em;">Japanese Patent Office</div> </td> <td style="padding: 5px;">           Signature of Authorized Officer         </td> </tr> </table>   |   |                                     | Date of the Actual Completion of the International Search<br><br><div style="text-align: center; font-family: monospace; font-size: 1.1em;">November 16, 1988 (16. 11. 88)</div> | Date of Mailing of this International Search Report<br><br><div style="text-align: center; font-family: monospace; font-size: 1.1em;">November 28, 1988 (28. 11. 88)</div> | International Searching Authority<br><br><div style="text-align: center; font-family: monospace; font-size: 1.1em;">Japanese Patent Office</div> | Signature of Authorized Officer |   |     |   |  |     |
| Date of the Actual Completion of the International Search<br><br><div style="text-align: center; font-family: monospace; font-size: 1.1em;">November 16, 1988 (16. 11. 88)</div>   | Date of Mailing of this International Search Report<br><br><div style="text-align: center; font-family: monospace; font-size: 1.1em;">November 28, 1988 (28. 11. 88)</div>  |                                     |  |  |  |                                 |   |     |   |  |     |
| International Searching Authority<br><br><div style="text-align: center; font-family: monospace; font-size: 1.1em;">Japanese Patent Office</div>   | Signature of Authorized Officer   |                                     |  |  |  |                                 |   |     |   |  |     |

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM THE SECOND SHEET

|   |   |     |
|---|---|-----|
| Y | Chemical Abstract, Vol. 107, No. 11,<br>14 September 1987 (14. 09. 87)<br>(Columbus, Ohio, U.S.A.)<br>Lin Jenq Tain, M. Asai, T. Ohnogi,<br>T. Yamazaki, T. Kitazume, "Lipase-<br>catalyzed hydrolysis as a route to<br>chiral monofluoromethylated carbinols"<br>See, Abstract No. 95238y,<br>Chem. Express, 1987, 2(5), 293-6 (Japan) | 1-4 |
| Y | JP, A, 59-205989 (Sumitomo Chemical<br>Co., Ltd.)<br>21 November 1984 (21. 11. 84)<br>& WO, A1, 8404543 & EP, A1, 148272  | 1-4 |

V. ☐ OBSERVATIONS WHERE CERTAIN CLAIMS WERE FOUND UNSEARCHABLE<sup>10</sup>

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2) (a) for the following reasons:

1. ☐ Claim numbers ..... because they relate to subject matter<sup>12</sup> not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claim numbers ..... because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out<sup>12</sup>, specifically:

VI. ☐ OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING<sup>11</sup>

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims of the international application.

2. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims of the international application for which fees were paid, specifically claims:

3. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claim numbers:

4. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, the International Searching Authority did not invite payment of any additional fee.

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM THE SECOND SHEET

|   |  |     |
|---|--|-----|
| Y | JP, A, 62-134089 (NGK Insulators, Ltd.)<br>17 June 1987 (17. 06. 87)<br>(Family: none)       | 1-4 |
| Y | JP, A, 62-36193 (NGK Indulators, Ltd.)<br>17 February 1987 (17. 02. 87)<br>(Family: none)    | 1-4 |
| Y | JP, A, 62-21769 (NGK Spark Plug Co., Ltd.)<br>30 January 1987 (30. 01. 87)<br>(Family: none) | 1-4 |

V. ☐ OBSERVATIONS WHERE CERTAIN CLAIMS WERE FOUND UNSEARCHABLE<sup>10</sup>

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2) (a) for the following reasons:

1. ☐ Claim numbers \_\_\_\_\_ because they relate to subject matter<sup>12</sup> not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claim numbers \_\_\_\_\_ because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out<sup>13</sup>, specifically:

VI. ☐ OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING<sup>11</sup>

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims of the international application.

2. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims of the international application for which fees were paid, specifically claims:

3. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claim numbers:

4. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, the International Searching Authority did not invite payment of any additional fee.

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

|  |   |             |
|--|---|-------------|
| I. 発明の属する分野の分類   |   |             |
| 国際特許分類 (IPC) Int. Cl.<br>C12P7/62, 41/00   |   |             |
| II. 国際調査を行った分野   |   |             |
| 調 査 を 行 っ た 最 小 限 資 料  |   |             |
| 分 類 体 系  | 分 類 記 号   |             |
| IPC  | C12P7/62, 41/00, C12N11/14  |             |
| 最小限資料以外の資料で調査を行ったもの  |   |             |
| Computer search CAS online   |   |             |
| III. 関連する技術に関する文献  |   |             |
| 引用文献の<br>カテゴリー ※   | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示   | 請求の範囲の番号    |
| P  | Chemical Abstract, 第109巻, 第11号, (1988)<br>(Columbus, Ohio, U.S.A) T. Kitazume,<br>N. Okamura, T. Ikeya, T. Yamazaki, "Synthesis<br>of optically active fluorinated<br>materials by use of immobilized<br>enzymes for asymmetric hydrolysis"<br>要約番号 89261a 参照, J. Fluorine Chem.,<br>1988, 39(1), 107-115 (Eng) | 1-4         |
| Y  | Chemical Abstract, 第102巻, 第9号, 4. 3月.<br>1985 (04. 03. 85) (Columbus, Ohio, U.S.A)<br>T. Kitazume, T. Sato, N. Ishikawa,<br>"Enantioselective synthesis of<br>monofluorinated malonic acid<br>monoesters with enzymes of microbial<br>origin" 要約番号 75208g 参照, Chem. Lett.,<br>1984, (10), 1811-14 (Eng)         | 1-4         |
| <p>※引用文献のカテゴリー</p> <p>「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの</p> <p>「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの</p> <p>「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日<br/>若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献<br/>(理由を付す)</p> <p>「O」 口頭による開示、使用、展示等に関する文献</p> <p>「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の<br/>日の後に公表された文献</p> <p>「T」 国際出願日又は優先日の後に公表された文献であって出<br/>願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解<br/>のために引用するもの</p> <p>「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新<br/>規性又は進歩性がないと考えられるもの</p> <p>「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の<br/>文献との、当業者にとって自明である組合せによって進<br/>歩性がないと考えられるもの</p> <p>「&amp;」 同一パテントファミリーの文献</p> |   |             |
| IV. 認 証  |   |             |
| 国際調査を完了した日<br>16. 11. 88   | 国際調査報告の発送日<br>28.11.88  |             |
| 国際調査機関<br>日本国特許庁 (ISA/JP)  | 権限のある職員<br>特許庁審査官 平 田 和 男   | 4 B 7 8 2 3 |

第2ページから続く情報

|   |   |     |
|---|---|-----|
|   | (I 欄の続き)  |     |
| Y | Chemical Abstract, 第107巻, 第11号, 14.9月. 1987(14. 09. 87)(Columbus, Ohio, U.S.A) Lin Jenq Tain, M. Asai, T. Ohnogi, T. Yamazaki, T. Kitazume, "Lipase-catalyzed hydrolysis as a route to chiral monofluoromethylated carbinols" 要約番号 95238y 参照, Chem Express, 1987, 2(5), 293-6 (Japan) | 1-4 |
| Y | JP, A, 59-205989 (住友化学株式会社) 21. 11月. 1984 (21. 11. 84) & WO, A1, 8404543 & EP, A1, 148272   | 1-4 |

V. ☐ 一部の請求の範囲について国際調査を行わないときの意見

次の請求の範囲については特許協力条約に基づく国際出願等に関する法律第8条第3項の規定によりこの国際調査報告を作成しない。その理由は、次のとおりである。

1. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、国際調査をすることを要しない事項を内容とするものである。
2. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、有効な国際調査をすることができる程度にまで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。
3. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲でありかつ PCT 規則 6.4(a) 第2文の規定に従って起草されていない。

VI. ☐ 発明の単一性の要件を満たしていないときの意見

次に述べるようにこの国際出願には二以上の発明が含まれている。

1. ☐ 追加して納付すべき手数料が指定した期間内に納付されたので、この国際調査報告は、国際出願のすべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加して納付すべき手数料が指定した期間内に一部分しか納付されなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付があった発明に係る次の請求の範囲について作成した。  
請求の範囲 \_\_\_\_\_
3. ☐ 追加して納付すべき手数料が指定した期間内に納付されなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲に最初に記載された発明に係る次の請求の範囲について作成した。  
請求の範囲 \_\_\_\_\_
4. ☐ 追加して納付すべき手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加して納付すべき手数料の納付を命じなかった。

追加手数料異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加して納付すべき手数料の納付と同時に、追加手数料異議の申立てがされた。
- ☐ 追加して納付すべき手数料の納付に際し、追加手数料異議の申立てがされなかった。



| Ⅲ. 関連する技術に関する文献 (第2ページからの続き) |   |          |
|------------------------------|---|----------|
| 引用文献の<br>サマリー                | 引用文献名及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示                                    | 請求の範囲の番号 |
| Y                            | JP, A. 62-134089 (日本碍子株式会社)<br>17. 6月. 1987 (17. 06. 87) (ファミリーなし)  | 1-4      |
| Y                            | JP, A. 62-36193 (日本碍子株式会社)<br>17. 2月. 1987 (17. 02. 87) (ファミリーなし)   | 1-4      |
| Y                            | JP, A. 62-21769 (日本特殊陶業株式会社)<br>30. 1月. 1987 (30. 01. 87) (ファミリーなし) | 1-4      |

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile   | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|--|--------------------|
| X          | EHRLER ET AL: "Notiz über<br>microbiologische Umsetzungen mit<br>Halobacterium halobium: Reduktion von<br>3-Oxobutansäure-ethylester und Hydrolyse<br>von 3-Hydroxybutansäure-ethylester.<br>Cooperative Effekte von Reduktase und<br>Hydrolase"<br>HELVETICA CHIMICA ACTA,<br>Bd. 72, 1989, Seiten 793--799, XP002008201<br>siehe Seite 796 - Seite 798; Tabelle 2<br>----- | 1,6                |
| A          | EP 0 645 453 A (DAICEL CHEM) 29. März 1995<br>siehe Seite 7, Zeile 31 - Zeile 51;<br>Beispiele 16-19<br>-----  | 2-4                |

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/01017

| Im Recherchenbericht<br>angeführtes Patentdokument | Datum der<br>Veröffentlichung | Mitglied(er) der<br>Patentfamilie | Datum der<br>Veröffentlichung |
|--|-------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|
| WO 9318138 A                                       | 16-09-1993                    | CA 2117482 A                      | 16-09-1993                    |
|  |                               | DE 59306681 D                     | 10-07-1997                    |
|  |                               | DK 630402 T                       | 22-12-1997                    |
|  |                               | EP 0630402 A                      | 28-12-1994                    |
|  |                               | JP 7505770 T                      | 29-06-1995                    |
|  |                               | US 5523223 A                      | 04-06-1996                    |
| EP 0645453 A                                       | 29-03-1995                    | JP 7231785 A                      | 05-09-1995                    |
|  |                               | US 5763236 A                      | 09-06-1998                    |

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
 IPK 6 C12N15/53 C12P7/42 C12P7/62 C12P11/00 C12P13/02

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)  
 IPK 6 C12P C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile  | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|---|--------------------|
| X          | WO 93 18138 A (KERNFORSCHUNGSANLAGE JUELICH) 16. September 1993<br>siehe Seite 10 - Seite 16; Anspruch 5;<br>Beispiel 3; Tabelle 4  | 1,6,7              |
| Y          | ---<br>siehe Anspruch 5; Beispiel 3; Tabelle 4  | 2,3                |
| Y          | KITA: "cloning of the aldehyde reductase gene from a red yeast, <i>Sporobolomyces salmonicolor</i> , and characterization of the gene and its product"<br>APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY,<br>Bd. 62, Nr. 7, Juli 1996, Seiten<br>2303-2310, XP002105940<br>siehe Seite 2308 - Seite 2309; Abbildungen<br>2,3,7<br>---<br>-/-- | 2,3                |

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

16. Juni 1999

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

29/06/1999

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde  
 Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
 NL - 2280 HV Rijswijk  
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.  
 Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

van Klompenburg, W

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
IPK 6 C12N15/53 C12P7/42 C12P7/62 C12P11/00 C12P13/02

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RESEARCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)  
IPK 6 C12P C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile   | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|--|--------------------|
| X          | WO 93 18138 A (KERNFORSCHUNGSANLAGE JUELICH) 16. September 1993<br>siehe Seite 10 - Seite 16; Anspruch 5;<br>Beispiel 3; Tabelle 4   | 1,6,7              |
| Y          | siehe Anspruch 5; Beispiel 3; Tabelle 4  | 2,3                |
| Y          | KITA: "cloning of the aldehyde reductase gene from a red yeast, Sporobolomyces salmonicolor, and characterization of the gene and its product"<br>APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY,<br>Bd. 62, Nr. 7, Juli 1996, Seiten<br>2303-2310, XP002105940<br>siehe Seite 2308 - Seite 2309; Abbildungen<br>2,3,7 | 2,3                |

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen☒ Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

16. Juni 1999

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

29/06/1999

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

van Klompenburg, W

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie <sup>o</sup> | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile   | Betr. Anspruch Nr. |
|------------------------|--|--------------------|
| X                      | EHRLER ET AL: "Notiz über<br>microbiologische Umsetzungen mit<br>Halobacterium halobium: Reduktion von<br>3-Oxobutansäure-ethylester und Hydrolyse<br>von 3-Hydroxybutansäure-ethylester.<br>Cooperative Effekte von Reduktase und<br>Hydrolase"<br>HELVETICA CHIMICA ACTA,<br>Bd. 72, 1989, Seiten 793--799, XP002008201<br>siehe Seite 796 - Seite 798; Tabelle 2<br>----- | 1,6                |
| A                      | EP 0 645 453 A (DAICEL CHEM) 29. März 1995<br>siehe Seite 7, Zeile 31 - Zeile 51;<br>Beispiele 16-19<br>-----  | 2-4                |

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 99/01017

| Patent document<br>cited in search report | Publication<br>date | Patent family<br>member(s) | Publication<br>date |
|---|---------------------|----------------------------|---------------------|
| WO 9318138 A                              | 16-09-1993          | CA 2117482 A               | 16-09-1993          |
|   |                     | DE 59306681 D              | 10-07-1997          |
|   |                     | DK 630402 T                | 22-12-1997          |
|   |                     | EP 0630402 A               | 28-12-1994          |
|   |                     | JP 7505770 T               | 29-06-1995          |
|   |                     | US 5523223 A               | 04-06-1996          |
| EP 0645453 A                              | 29-03-1995          | JP 7231785 A               | 05-09-1995          |
|   |                     | US 5763236 A               | 09-06-1998          |

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT  
AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

|   |  |   |
|---|--|---|
| Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts | WEITERES<br>VORGEHEN                             | siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen<br>Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit<br>zutreffend, nachstehender Punkt 5 |
| L07839 L.P.1778                         |  |   |
| Internationales Aktenzeichen            | Internationales Anmeldedatum<br>(Tag/Monat/Jahr) | (Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr)  |
| PCT/EP 99/01017                         | 18/02/1999                                       | 18/02/1998  |
| Anmelder                                |  |   |
| LONZA AG et al.                         |  |   |

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 3 Blätter.  
☒ Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. Grundlage des Berichts

- a. Hinsichtlich der **Sprache** ist die internationale Recherche auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der Sprache durchgeführt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.
- ☐ Die internationale Recherche ist auf der Grundlage einer bei der Behörde eingereichten Übersetzung der internationalen Anmeldung (Regel 23.1 b)) durchgeführt worden.
- b. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale Recherche auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das
- ☐ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- ☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- ☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfaßten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.
2. ☐ Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen (siehe Feld I).
3. ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung (siehe Feld II).

4. Hinsichtlich der **Bezeichnung der Erfindung**

- ☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.
- ☐ wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt:

5. Hinsichtlich der **Zusammenfassung**

- ☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.
- ☐ wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der in Feld III angegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Behörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.

6. Folgende Abbildung der **Zeichnungen** ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen: Abb. Nr. 1
- ☒ wie vom Anmelder vorgeschlagen
- ☐ weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.
- ☐ weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.
- ☐ keine der Abb.



(19)



Europäisches Patentamt  
European Patent Office  
Office européen des brevets



(11) Publication number:

**0 645 453 A2**

(12)

**EUROPEAN PATENT APPLICATION**

(21) Application number: 94115138.3

(22) Date of filing: 26.09.94

(51) Int. Cl.<sup>6</sup>: **C12N 15/53**, C12N 9/04,  
C12N 1/21, C12N 15/70,  
C12P 7/24, C12P 7/04,  
C12P 41/00

(30) Priority: 24.09.93 JP 261649/93  
28.12.93 JP 337191/93  
02.08.94 JP 181308/94

(43) Date of publication of application:  
29.03.95 Bulletin 95/13

(84) Designated Contracting States:  
**DE FR GB IT NL**

(71) Applicant: **DAICEL CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.**  
1, Teppo-cho  
Sakai-shi,  
Osaka (JP)

(72) Inventor: Kojima, Tomoko  
3-11 2-chome,  
Umezono  
Tsukuba-shi,

Ibaraki (JP)  
Inventor: Yamamoto, Hiroaki  
14-14-103 1-chome Sengen  
Tsukuba-shi,

Ibaraki (JP)  
Inventor: Kawada, Naoki  
14-14-304 1-chome Sengen  
Tsukuba-shi,  
Ibaraki (JP)

Inventor: Matsuyama, Akinobu  
125-1-104 Nakagawa  
Arai-shi,  
Niigata (JP)

(74) Representative: **KUHNEN, WACKER & PARTNER**  
Alois-Steinecker-Strasse 22  
D-85354 Freising (DE)

(54) Alcohol de hydrogenase, DNA encoding it, preparation and method of preparing optically active alcohols.

(57)

[Object]

The present invention provides a novel secondary alcohol dehydrogenase useful for the synthesis of optically active alcohol and DNA encoding said enzyme. A microorganism belonging to genus *Candida* was found to produce a novel secondary alcohol dehydrogenase with a high stereochemical specificity. Using said enzyme, optically active alcohols were prepared, and by cloning of DNA encoding said enzyme, the base sequence of said DNA was determined. By providing a novel secondary alcohol dehydrogenase with a high stereochemical specificity and the gene encoding said enzyme, an efficient production of optically active alcohols became possible.

**EP 0 645 453 A2**

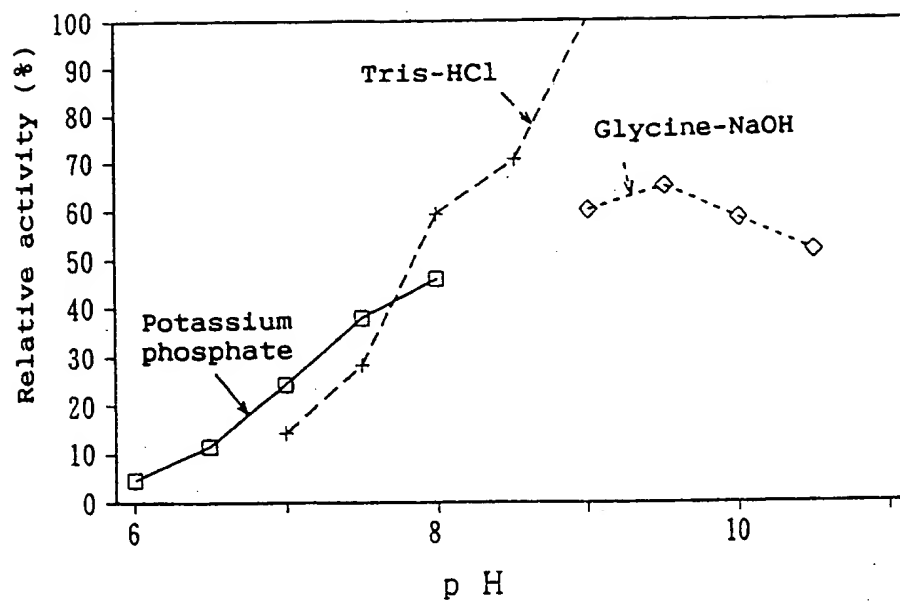


FIG. 2

Background of the InventionField of the Invention

5 The present invention relates to a method of producing a novel secondary alcohol dehydrogenase useful for the preparation of alcohol, aldehyde and ketone, especially for that of an optically active alcohol, a method of producing said enzyme, a DNA segment encoding said enzyme, a microorganism transformed with said DNA, and a method of producing alcohol, aldehyde and ketone, especially optically active alcohol using said enzyme.

10

Related Arts

Of the secondary alcohol dehydrogenase of the microbial origin requiring nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (abbreviated as NADP<sup>+</sup> hereinafter), the one derived from *Thermoanaerobium*  
 15, *brockii* is well documented (J. Am. Chem. Soc. 108, 162-169 (1986)). In addition, of the secondary alcohol dehydrogenase requiring nicotinamide adenine dinucleotide (abbreviated as NAD<sup>+</sup> hereinafter), there have been reported those derived from *Pichia* sp. NRRL-Y-11328 (Eur. J. Biochem. 101, 401-406 (1979)), *Pseudomonas* sp. SPD6 (Bioorg. Chem. 19, 398-417 (1991)), *Pseudomonas fluorescens* NRRL B-1244 (Tokkai Sho, 59-17982), *Pseudomonas maltophilia* MB11L (FEMS Microbiol. Lett. 93, 49-56 (1992)),  
 20 *Pseudomonas* sp. PED (J. Org. Chem. 57, 1526-1532 (1992)), *Pseudomonas* sp. ATCC 21439 (Eur. J. Biochem. 119, 359-364 (1981)), *Candida boidinii* SAHM (Biochim. Biophys. Acta 716, 298-307 (1992)), *Mycobacterium vaccae* JOB-5 (J. Gen. Microbiol. 131, 2901-2907 (1985)), *Rhodococcus rhodochrous* PNKb1 (Arch. Microbiol. 153, 163-168 (1990)), *Comamonas terrigena* (Biochim. Biophys. Acta 661, 74-86 (1981)), and *Arthrobacter* sp. SBA (Tokkai Sho 51-57882).

25 However, the stereochemical substrate specificity of these secondary alcohol dehydrogenases is not satisfactory for the practical application. For example, as to 2-butanol, one of the most frequently reported substrates of the secondary alcohol dehydrogenase, there has not been reported the enzyme which will oxidize (*S*)-2-butanol stereospecifically to produce 2-butanone. (The enzymes derived from *Pseudomonas* sp. ATCC 21439, *Pseudomonas* sp. SPD6, *Comamonas terrigena*, *Candida boidinii* SAHM or *Pichia* sp.  
 30 NRRL-Y-11328 oxidize (*R*)-isomer preferentially, while the one derived from *Pseudomonas fluorescens* NRRL B-1244 does not show any definite substrate stereochemical specificity, and the specificity of the enzyme derived from *Mycobacterium vaccae* JOB-5, *Rhodococcus rhodochrous* PNKb1, *Pseudomonas* sp. PED or *Pseudomonas maltophilia* MB11L has not been reported.) Furthermore, although the primary alcohol dehydrogenase (SADH-1) derived from baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) has been  
 35 reported to oxidize 2-butanol with *S* configuration preferentially, the relative activity is as low as about 1% of that for ethanol, not suitable for practical use (Arch. Biochem. Biophys. 126, 933-944 (1968), J. Biol. Chem. 268, 7792-7798 (1993)).

Since the secondary alcohol dehydrogenase which will preferentially oxidize *S*-2-butanol has not been reported, there has been a strong demand for finding the enzyme with a high substrate stereochemical  
 40 specificity.

There has been also a high demand for cloning DNA encoding said enzyme, because it will be possible to produce said enzyme on a large scale with a genetic engineering technique using the cloned gene of said enzyme.

45 Summary of the Invention

During the wide-screening of microorganisms having the activity to preferentially oxidize (*S*)-2-butanol, the inventors of the present invention discovered that the microorganism belonging to genus *Candida*, especially *Candida parapsilosis* had the activity to preferentially oxidize (*S*)-2-butanol, further purified the  
 50 enzyme to oxidize (*S*)-2-butanol from cells of cultured said microorganism, and studied its enzymatic properties finding that said enzyme has the ability to oxidize (*S*)-2-butanol with a high stereochemical specificity and also oxidize various other secondary alcohols stereospecifically.

It is one object of the present invention to provide an enzyme with the following physicochemical properties as defined in 1) to 9):

55

## 1) Functions

Said enzyme oxidizes alcohol with  $\text{NAD}^+$  as the coenzyme to produce the corresponding ketone or aldehyde, and also reduces ketone or aldehyde with  $\text{NADH}$  as the coenzyme to produce the corresponding alcohol.

## 2) Substrate specificity

Said enzyme utilizes aliphatic alcohols including those with an aromatic substitution as its oxidizing substrate, has a relatively higher activity toward secondary alcohols than primary ones, and preferentially oxidizes 2-butanol with the *S* configuration. Said enzyme also utilizes aldehydes or aliphatic ketones with an aromatic substitution.

## 3) Molecular weight

The apparent molecular weight of said enzyme is estimated to be approximately 40,000 by SDS-PAGE. Physicochemical as well as enzymatic properties of said enzyme of the present invention are as follows:

## 4) Optimal pH and pH range for the enzyme stability

The optimal pH for the oxidation of (*S*)-2-butanol ranges from 8.5 to 9.5, and that for the reduction of 2-butanone from 5.5 to 6.5. Said enzyme is relatively stable in the pH range from 8.0 TO 10.0.

## 5) Optimal temperature range for the enzymatic reaction

Said enzyme shows the high activity at the temperature ranging from 25 - 55 °C with 50 °C as optimal for the enzymatic reaction.

## 6) Thermal inactivation

Said enzyme retains more than 90% of the original activity even after the heat treatment at 40 °C for 10 min.

## 7) Inhibition and stabilization

The activity of said enzyme is inhibited by various SH-reagents such as *p*-mercuribenzoic acid, mercuric chloride, zinc chloride and *N*-ethylmaleimide, and also by the reducing agents including 2-mercaptoethanol and dithiothreitol. Said enzyme activity is inhibited by  $\alpha$ -phenanthroline but not by ethylenediaminetetraacetic acid.

## 8) Purification

Said enzyme can be purified to a single protein band on the sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (abbreviated as SDS-PAGE hereinafter) by combining the conventional purification methods of ordinary proteins, comprising, for example, protamine sulfate precipitation after disrupting microbial cells, ammonium sulfate fractionation of the centrifuged supernatant, followed by a combination of anion exchange chromatography, hydrophobic chromatography and gel filtration.

## 9) Isoelectric point

Although said enzyme shows several bands on isoelectric focusing, the isoelectric point of the major protein band is located at pH 6.7.

The activity of all secondary alcohol dehydrogenases including said enzyme described in the preferred embodiments of the present specification was assayed as follows: (*S*)-2-butanol (50  $\mu\text{mol}$ ) and the enzyme were incubated in a reaction mixture containing Tris-HCl (50  $\mu\text{mol}$ , pH 9.0) and  $\text{NAD}^+$  (2.5  $\mu\text{mol}$ ) at 30 °C, and the rate of  $\text{NADH}$  formation was followed at 340 nm. One unit of enzyme was defined as the amount of enzyme necessary to catalyze the formation of 1  $\mu\text{mol}$  of  $\text{NADH}$  per min under the assay conditions.

It is another object of the present invention to provide a DNA segment encoding said secondary alcohol dehydrogenase. Inventors of the present invention digested the purified said enzyme with lysylendopeptidase, purified the digested fragments by reversed phase chromatography, and determined a portion of its amino acid sequence using a protein sequencer. PCR (polymerase chain reaction) was performed using  
 5 primers synthesized based on said amino acid sequence determined above and the chromosomal DNA of *Candida parapsilosis* as the template. A portion of gene encoding said secondary alcohol dehydrogenase was amplified and its base sequence (core sequence) was determined. Then in order to elucidate the base sequence in the flanking region of said DNA sequence determined above (core sequence), the chromosomal DNA of *Candida parapsilosis* was digested with HaeII, a restriction enzyme without restriction  
 10 site in the core sequence. The template DNA used for reversed PCR (Nucleic Acids Res. 16, 8186 (1988)) was prepared by autorecyclization of DNA fragments obtained above using T4 DNA ligase. Based on the core sequence, primers serving as the initiation site of synthesis of DNA extending from the core sequence were prepared, and the flanking region of the core sequence was amplified by the reversed PCR. By elucidating DNA sequence thus obtained it was confirmed that the entire coding region of said secondary  
 15 alcohol dehydrogenase was included in the autorecircularized DNA as shown in Figs. 6, 7 and 8. Furthermore, the product of cloned gene expressed in host *Escherichia coli* cells was confirmed to have the enzymatic activity similar to that of said secondary alcohol dehydrogenase derived from *Candida parapsilosis*.

DNA encoding said secondary alcohol dehydrogenase of the present invention includes the base  
 20 sequence encoding the protein consisting of amino acid sequence essentially similar to that as shown in Figs. 6, 7 and 8. "Essentially" in this case means that amino acid sequence shown in Figs. 6, 7 and 8 can be modified by deletion, insertion or substitution of certain amino acid, so far as resulting proteins retain the secondary alcohol dehydrogenase activity. Needless to say DNA of the present invention includes DNA consisting of 1008 bases as shown in Figs. 6, 7 and 8, but is not restricted to this. DNA modification which  
 25 will lead to deletion, insertion or substitution in the amino acid sequence coded by DNA is suitably accomplished by conventional method such as the site-specific mutation using synthetic oligonucleotide. Further, DNA with random mutation can be obtained by performing PCR using DNA consisting of 1008 bases shown in Figs. 6, 7 and 8 or suitably modified said DNA as the template in the presence of  $Mn^{2+}$  - (usually 0.5 - 10 mM) or lowered concentration of certain nucleotide. Needless to say, of DNAs thus  
 30 obtained the present invention includes DNA encoding the protein with said secondary alcohol dehydrogenase activity.

It is another object of the present invention to provide a microorganism which is stably transformed with the DNA molecule encoding the protein having an amino acid sequence essentially similar to that shown in Figs. 6, 7 and 8 and capable of producing said secondary alcohol dehydrogenase.

35 Any microorganism which can be transformed with the DNA segment encoding a peptide having said secondary alcohol dehydrogenase activity and is capable of expressing said activity will be the object of transformation in the present invention. Actually it comprises bacteria, yeasts and molds the host/vector system of which are well developed. Bacteria includes *Escherichia*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Streptococcus* and *Lactobacillus*. Yeasts include *Saccharomyces*,  
 40 *Kluyveromyces*, *Schizosaccharomyces*, *Zygosaccharomyces*, *Yarrowia*, *Trichosporon*, *Rhodospiridium*, *Hansenula*, *Pichia* and *Candida*. Molds include *Neurospora*, *Aspergillus*, *Cephalosporium* and *Trichoderma*.

A procedure or method for preparing a transformant can be performed according to the conventional technique used in the field of molecular biology, biotechnology and genetic engineering.

45 In order to express the gene of the present invention in microorganism, it is necessary to insert said gene into the plasmid vector or phage vector stably present in said microorganism. For expressing said DNA of the present invention in microorganism it is also necessary to transcribe and translate the genetic information held in said gene. It can be accomplished by inserting a promoter and a terminator, the controlling unit for transcription and translation, into the upstream and downstream of 5'-end of said DNA of  
 50 the present invention, respectively. For this purpose it is important to use a promoter and terminator which are known to function in the microorganism to be used as the host cell. Promoters and terminators usable with various microorganisms are described in detail in "Biseibutsugaku Kisokoza (Basic Microbiology), Vol. 8, Genetic Technology, Kyoritsu Shuppan (1990)", especially those usable with yeast in "Adv. Biochem. Eng. 43, 75-102 (1990)" or "Yeast 8, 423-488 (1992)".

55 For example, possible plasmid vectors for use with *Escherichia*, especially *Escherichia coli*, include the plasmid of pBR and pUC series, and possible promoters for use include *lac* promoter ( $\beta$ -galactosidase), *trp* operon (tryptophan operon), and *tac* promoter (*lac-trp* hybrid promoter), and  $\lambda$  phage PL or PR-derived promoters. Furthermore, possible terminators for use include *trpA*- or phage-derived *rrnB* ribosomal

terminator.

Possible plasmid vectors for use with *Bacillus* include the plasmid of pUB110 series or pC194 series which can be directly inserted into chromosome. Furthermore, possible promoters or terminators for use with this species include *apr* (alkaline protease), *npr* (neutral protease) and *amy* ( $\alpha$ -amylase) promoters.

5 Possible plasmid vectors for use with *Pseudomonas*, especially with *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas cepacia* include the newly developed host vector system such as pKT240, a vector with a wide host cell spectrum derived from TOL plasmid participating in the toluene decomposition (vector also includes the gene necessary for the autonomous replication derived from RSF1010 and others), and possible promoters and terminators include the lipase gene (JPH5-284973).

10 Possible plasmid vectors for use with *Brevibacterium*, especially with *Brevibacterium lactofermentum* include pAJ43, and possible promoters and terminators for use are the same as those used with *Escherichia*.

Possible plasmid vectors for use with *Corynebacterium*, especially with *Corynebacterium glutamicum* include pCS11 (JPS57-183799) and pCB101 (Mol. Gen. Genet. 196, 175 (1984)).

15 Possible plasmid vectors for use with *Streptococcus* include those such as pHV1301 (FEMS Microbiol. Lett. 26, 239 (1985)) and pGK1 (Appl. Environ. Microbiol. 50, 94 (1985)).

Possible plasmid vectors for use with *Lactobacillus* are those developed for use with *Streptococcus* such as pAM $\beta$ 1 (J. Bacteriol. 137, 614 (1979)), and possible promoters for use are those for use with *Escherichia*.

20 Possible plasmid vectors for use with *Saccharomyces*, especially *Saccharomyces cerevisiae* include those of series YRp, YE<sub>p</sub>, YC<sub>p</sub> and Ylp. Integration vector (e.g., in EP 537456) constituted by utilizing homologous recombination with ribosomal DNA having multicopy in the chromosome is useful for the insertion of multicopy and for the stable gene retention. In addition, plasmid vectors carrying ADH (alcohol dehydrogenase), GAPDH (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase), PHO (acid phosphatase), GAL ( $\beta$ -galactosidase), PGK (phosphoglycerate kinase) and ENO (enolase) are also usable as the promoter or  
25 terminator with this species.

Possible plasmid vectors for use with *Kluyveromyces*, especially *Kluyveromyces lactis* include 2  $\mu$ m series plasmid derived from *Saccharomyces cerevisiae*, pKD1 series plasmid (J. Bacteriol. 145, 382-390 (1981)), pGK11-derived plasmid related to killer activity, KARS series plasmid with the autonomous replication gene of *Kluyveromyces* and integration vector (e.g., in EP 537456) which can integrate in the  
30 gene by homologous replication with ribosomal DNA. Vectors inserted the gene encoding ADH or PGK are also usable as the promoter or terminator.

Possible plasmid vectors for use in *Schizosaccharomyces* include those with the insertion of a) ARS (gene related to autonomous replication) derived from *Schizosaccharomyces pombe*, b) the selective marker derived from *Saccharomyces cerevisiae* and complementary to auxotrophy (Mol. Cell Biol. 6, 80 (1986)), and c) ADH promoter derived from *Saccharomyces pombe* (EMBO J. 6, 729 (1987)).

Possible plasmid vectors for use in *Zygosaccharomyces* include pSB3 derived from *Zygosaccharomyces rouxii* (Nuclei Acids Res. 13, 4267 (1985)), PHO5 promoter derived from *Saccharomyces cerevisiae*, and GAP-Zr (carrying the gene for glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) promoter  
40 derived from *Zygosaccharomyces rouxii* (Agri. Biol. Chem. 54, 2521 (1990)).

Possible plasmid vectors for use in *Hansenula* include the host vector system developed in *Hansenula polymorpha* comprising HARS1 and HARS2, the autonomous replication sequence from *Hansenula polymorpha*, which, however, are relatively unstable. Therefore, the integration vector carrying multicopy in chromosome is useful (Yeast 7, 431-448 (1991)). Promoters for methanol-inducible AOX (alcohol dehydrogenase) or FDH (formate dehydrogenase) are also useful.  
45

Possible plasmid vectors for use in *Pichia* include the host vector system developed in *Pichia pastoris* using the gene participating in the autonomous replication in *Pichia* (Mol. Cell. Biol. 5, 3376 (1985)) and the potent promoter for AOX inducible by the high concentration culture in the presence of methanol (Nucleic Acid Res. 15, 3859 (1987)).

50 As possible plasmid vectors for use in *Candida* the host vector system has been developed in *Candida maltosa*, *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. In *Candida maltosa*, the plasmid vector with the insertion of cloned ARS (autonomous replication sequence) derived from *Candida maltosa* (Agri. Biol. Chem. 51, 51, 1587 (1987)) has been developed for use.

Possible plasmid vectors for use in *Aspergillus*, one of the most thoroughly studied molds, include the  
55 vector constructed by the integration of gene into the plasmid or chromosome and the promoter for the extracellular protease or amylase (Trends in Biotechnology 7, 283-287 (1989)).

As possible plasmid vectors for use in *Trichoderma*, the host vector system has been developed in *Trichoderma reesei*, and the promoter for the extracellular cellulase is useful for the vector construction

(Biotechnology 7, 596-603 (1989)).

A method of producing the enzyme of the present invention comprises culturing cells belonging to genus *Candida* or its mutant having the producibility of said enzyme with the following properties 1) to 3) or recombinant cells endowed with the producibility of said enzyme by inserting the gene encoding said enzyme into a foreign microorganism host.

#### 1) Function

Said enzyme oxidizes alcohol with  $\text{NAD}^+$  as the coenzyme producing corresponding ketone or aldehyde. Also said enzyme reduces ketone or aldehyde with  $\text{NADH}$  as the coenzyme producing corresponding alcohol.

#### 2) Substrate specificity

Said enzyme utilizes aliphatic alcohols with aromatic substitution as the substrate for its oxidation reaction, showing higher activity toward secondary alcohols as compared with primary ones and oxidizing (*S*)-2-butanol preferentially. Aldehydes or ketones with aromatic substitution are the substrate for reduction reaction of said enzyme.

#### 3) Molecular weight

The apparent molecular weight of said enzyme is estimated to be about 40,000 by SDS-PAGE.

Furthermore, said enzyme of the present invention, or microorganism containing said enzyme (including its mutant strain and recombinant microorganism), or the processed product thereof can be used to react with the racemic aliphatic alcohol with a possible aromatic substitution such as 2-butanol, 2-octanol, phenylethanol, 1,3-butanediol and ethyl  $\beta$ -hydroxy-n-butylate, oxidizing only one of the optically active isomers (e.g., (*S*)-isomer in the case of 2-butanol, 2-octanol, phenylethanol, 1,3-butanediol and ethyl  $\beta$ -hydroxy-n-butylate) and producing the other optically active isomer (*R*-isomer in the case of 2-butanol, 2-octanol, phenylethanol, 1,3-butanediol and ethyl  $\beta$ -hydroxy-n-butylate). In this oxidation reaction the coenzyme  $\text{NAD}^+$  is reduced to  $\text{NADH}$ .

$\text{NADH}$  thus produced can be converted (regenerated) to  $\text{NAD}^+$  by, for example, the microbial ability to convert  $\text{NADH}$  to  $\text{NAD}^+$ .  $\text{NAD}^+$  can be regenerated by adding the enzyme having the activity to oxidize  $\text{NADH}$  to  $\text{NAD}^+$  such as glutamate dehydrogenase, glucose dehydrogenase,  $\text{NADH}$  dehydrogenase and  $\text{NADH}$  oxidase, or microorganisms containing these enzymes or the processed products thereof to the reaction system. Taking advantage of the substrate specificity of said enzyme of the present invention, a simultaneous regeneration of  $\text{NAD}^+$  with said enzyme alone can be accomplished by adding inexpensive substrate of reducing reaction of said enzyme such as acetone or 2-butanone to the reaction system. Also an optically active alcohol can be produced by treating the corresponding ketonic compound with said secondary alcohol dehydrogenase of the present invention or microorganism producing said enzyme (including its mutant strain or recombinant cell) or the processed product thereof; for example, (*S*)-2-butanol from 2-butanone, (*S*)-octanol from 2-octanone, (*S*)-1-phenylethanol from acetophenone, (*S*)-1,3-butanediol from 4-hydroxy-2-butanone, (*S*)- $\beta$ -hydroxy-n-butylic acid ester from acetoacetic acid ester. By this reducing reaction, the coenzyme  $\text{NADH}$  is oxidized to generate  $\text{NAD}^+$ .

$\text{NAD}^+$  thus produced can be converted (regenerated) to  $\text{NADH}$  by, for example, the activity of microorganism to convert  $\text{NAD}^+$  to  $\text{NADH}$ . The  $\text{NAD}^+$  reducing activity can be amplified by adding glucose, ethanol or formate to the reaction system.  $\text{NAD}^+$  can be reduced also by adding the enzyme capable of reducing  $\text{NAD}^+$  to  $\text{NADH}$  such as formate dehydrogenase, malate dehydrogenase and glucose dehydrogenase, or by adding microorganism containing these enzymes or the processed product thereof to the reaction system. Taking advantage of the substrate specificity of said enzyme, simultaneous regeneration of  $\text{NADH}$  can be accomplished with said enzyme alone by adding the substrate of oxidative reaction of said enzyme such as isopropanol or ethanol to the reaction system.

#### Brief description of the drawings

Fig. 1 shows the electrophoretic pattern of the purified said secondary alcohol dehydrogenase on sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel.

Fig. 2 shows the effect of pHs on the (*S*)-2-butanol oxidizing activity of said secondary alcohol dehydrogenase, expressed as relative to the maximum activity (100%) at the optimum pH.

Fig. 3 shows the effect of pHs on the 2-butanone reducing activity of said secondary alcohol dehydrogenase, expressed as relative to the maximum activity (100%) at the optimum pH.

Fig. 4 shows the effect of pHs on the remaining activity of said secondary alcohol dehydrogenase after the treatment of said enzyme at 30 °C for 30 min, expressed as relative to the initial activity (100%).

5 Fig. 5 shows the effect of heating at different temperature for 10 min on the remaining activity of said secondary alcohol dehydrogenase, expressed as relative to the initial activity (100%).

Fig. 6 shows the base sequence of DNA encoding said secondary alcohol dehydrogenase, amino acid sequence deduced from said base sequence and the regions of PCR and reversed PCR primers in said sequence.

10 Fig. 7 shows the base sequence of DNA encoding said secondary alcohol dehydrogenase, amino acid sequence deduced from said base sequence and the regions of PCR and reversed PCR primers in said sequence (continuation of Fig. 6).

Fig. 8 shows the base sequence of DNA encoding said secondary alcohol dehydrogenase, amino acid sequence deduced from said base sequence and the regions of PCR and reversed PCR primers in said sequence (continuation of Fig. 7).

Fig. 9 shows the base and amino acid sequences of the mixed PCR primers (CpN and CpT10). Plural bases assigned to the same position in the Figure indicate that the primer is a mixture of primers with plural codons for amino acid.

Fig. 10 shows the construction of plasmid pCPA6R.

20 Fig. 11 shows the construction of expression vector pKK-CPA1.

#### Preferred Embodiments

In the following section, preferred embodiments describe the present invention in greater detail.  
25 However, the present invention is not restricted to the example presented here.

#### Example 1 (Purification of secondary alcohol dehydrogenase)

**Candida parapsilosis** IF0 1396 strain was grown in a YM medium containing glucose (10 g),  
30 bactopecton (5 g), yeast extract (3 g) and malt extract (3 g) per liter at pH 6.0. Cells were harvested by centrifugation.

The wet cells thus obtained were disrupted in a high pressure cell disintegrator, and centrifuged to remove cell debris. To the cell-free extract protamine sulfate was added to remove nucleic acids and microsomes. After centrifugation, the supernatant was brought to 70% saturation with ammonium sulfate,  
35 and the precipitate was collected, subjected to anion exchange chromatography on Q-Sepharose FF, eluted with a density gradient of NaCl, and the peak fraction containing said secondary alcohol dehydrogenase activity was collected. The active fraction was then subjected to hydrophobic chromatography on a column of phenyl-Sepharose equilibrated with a buffer containing 1.62 M ammonium sulfate, and the active fraction was eluted by reducing the ammonium sulfate concentration to 0 M (the enzyme activity was assayed as  
40 described hereinbefore). After the active fraction was added to a Red Sepharose affinity column, the unretained fraction was subjected to a Superdex 200 gel filtration. The recovered active fraction was subjected to anion exchange chromatography on a Mono Q column and eluted with a density gradient of NaCl. Only active fractions which gave a single band in the purity test on SDS-PAGE were collected.

On polyacrylamide gel electrophoresis (Native-PAGE), the purified secondary alcohol dehydrogenase  
45 gave one major and several adjacent minor weak protein bands. On activity staining, all protein bands showed the secondary alcohol dehydrogenase activity, and on SDS-PAGE this enzyme preparation migrated as a single protein band.

The apparent molecular weight of the purified enzyme estimated by SDS-PAGE was about 40,000 (Fig. 1).

50 Table 1 summarizes the procedure that resulted in a purification of the enzyme with a specific activity of 1370 units/mg.



Table 1

|   | Volume (ml) | Total amount of protein (mg) | Total activity (U) | Specific activity (U/mg) | Yield (%) |
|---|-------------|------------------------------|--------------------|--------------------------|-----------|
| Crude extract   | 4,800       | 157,000                      | 40,100             | 0.255                    | 100.0     |
| Protamine sulfate                                       | 5,200       | 94,600                       | 35,200             | 0.371                    | 87.6      |
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (0-70%) | 550         | 78,700                       | 30,700             | 0.390                    | 76.5      |
| Q-Sepharose FF  | 550         | 8,870                        | 9,730              | 1.10                     | 24.2      |
| Phenyl Sepharose  | 22          | 191                          | 5,440              | 28.5                     | 13.6      |
| Red-Sepharose   | 2.4         | 22.1                         | 6,150              | 279                      | 15.3      |
| Superdex 200  | 5.34        | 3.7                          | 3,140              | 846                      | 7.8       |
| Mono-Q  | 1.05        | 1.7                          | 2,360              | 1,370                    | 5.9       |

#### Example 2 (pH Optimum of secondary alcohol dehydrogenase)

The effect of pH on the (*S*)-2-butanol oxidizing activity and 2-butanone reducing activity (assayed under the conditions for (*S*)-2-butanol oxidizing activity assay in the presence of NADH (0.4  $\mu$ mol in stead of NAD<sup>+</sup>, following the rate of the oxidation of NADH at 340 nm) was examined under different pHs using potassium phosphate (KPB), Tris-HCl and Briton-Robinson buffer. The enzyme activity relative to the maximum activity (100%) was shown in Figs. 2 and 3. The pH optimum for the oxidation of (*S*)-2-butanol was 8.5 - 9.5, while that for the reduction of 2-butanone was 5.5 - 6.5.

#### Example 3 (Optimum reaction temperature for secondary alcohol dehydrogenase)

The secondary alcohol dehydrogenase activity was assayed under the standard assay conditions at different temperature as shown in Table 2. The optimum reaction temperature of said enzyme was found to be 50 °C.

Table 2

|                       |    |    |    |     |    |    |
|-----------------------|----|----|----|-----|----|----|
| Temperature (°C)      | 30 | 37 | 45 | 50  | 55 | 60 |
| Relative activity (%) | 55 | 65 | 92 | 100 | 88 | 0  |

#### Example 4 (pH Stability of secondary alcohol dehydrogenase)

After the purified enzyme was incubated in Tris-HCl (pH 8.0 - 9.0) and Briton-Robinson buffer (pH 5.0 - 12.0) at 30 °C for 30 min, the remaining activity was assayed. Said enzyme was most stable at pH ranging from 8 to 10.0 (Fig. 4).

#### Example 5 (Thermostability of secondary alcohol dehydrogenase)

After the purified enzyme was incubated at pH 8.0 and 30 °C - 70 °C for 10 min, the remaining activity was assayed. Even after the incubation at 40 °C for 10 min, more than 90% of the original enzyme activity was retained (Fig. 5).

#### Example 6 (Substrate specificity of secondary alcohol dehydrogenase)

The oxidizing and reducing activities of said enzyme with various alcohols and aldehydes as the substrate respectively are summarized in Tables 3 and 4 respectively as compared with the (*S*)-2-butanol oxidizing activity (100%) and 2-butanone reducing activity (100%) respectively.

Table 3

| Oxidation | Substrate               | Concentration (mM) | Coenzyme         | Relative activity (%) |
|-----------|-------------------------|--------------------|------------------|-----------------------|
|           | 2-Propanol              | 100                | NAD <sup>+</sup> | 60.0                  |
|           | (S)-2-Butanol           | 50                 | NAD <sup>+</sup> | 100.0                 |
|           | (R)-2-Butanol           | 50                 | NAD <sup>+</sup> | 3.3                   |
|           | (RS)-2-Butanol          | 100                | NAD <sup>+</sup> | 43.5                  |
| 10        | 2-Pentanol              | 100                | NAD <sup>+</sup> | 34.0                  |
|           | 3-Pentanol              | 100                | NAD <sup>+</sup> | 10.4                  |
|           | 2-Hexanol               | 50                 | NAD <sup>+</sup> | 27.7                  |
|           | (S)-2-Octanol           | 5                  | NAD <sup>+</sup> | 67.7                  |
|           | (R)-2-Octanol           | 5                  | NAD <sup>+</sup> | 0.0                   |
| 15        | (RS)-2-Octanol          | 5                  | NAD <sup>+</sup> | 39.2                  |
|           | Cyclohexanol            | 20                 | NAD <sup>+</sup> | 52.8                  |
|           | (S)-1-Phenylethanol     | 50                 | NAD <sup>+</sup> | 89.3                  |
|           | (R)-1-Phenylethanol     | 50                 | NAD <sup>+</sup> | 1.1                   |
|           | (S)-1,3-Butanediol      | 50                 | NAD <sup>+</sup> | 17.8                  |
| 20        | (R)-1,3-Butanediol      | 50                 | NAD <sup>+</sup> | 0.3                   |
|           | 2,4-Pentanediol         | 100                | NAD <sup>+</sup> | 42.6                  |
|           | (2R,4R)-2,4-Pentanediol | 50                 | NAD <sup>+</sup> | 0.1                   |
|           | 4-Methyl-2-pentanol     | 20                 | NAD <sup>+</sup> | 40.8                  |
|           | (S)-1-Amino-2-propanol  | 50                 | NAD <sup>+</sup> | 3.2                   |
| 25        | (R)-1-Amino-2-propanol  | 50                 | NAD <sup>+</sup> | 7.9                   |

Table 4

| Oxidation | Substrate                     | Concentration (mM) | Coenzyme         | Relative activity (%) |
|-----------|-------------------------------|--------------------|------------------|-----------------------|
|           | (RS)-2-Hydroxybutyric acid    | 100                | NAD <sup>+</sup> | 0.3                   |
|           | Methanol                      | 100                | NAD <sup>+</sup> | 0.2                   |
| 35        | Ethanol                       | 100                | NAD <sup>+</sup> | 1.0                   |
|           | Aryl alcohol                  | 100                | NAD <sup>+</sup> | 2.4                   |
|           | 1-Propanol                    | 100                | NAD <sup>+</sup> | 1.5                   |
|           | 1-Butanol                     | 100                | NAD <sup>+</sup> | 2.3                   |
|           | 1-Pentanol                    | 100                | NAD <sup>+</sup> | 1.2                   |
| 40        | (S)-1,2-Propanediol           | 50                 | NAD <sup>+</sup> | 2.5                   |
|           | (R)-1,2-Propanediol           | 50                 | NAD <sup>+</sup> | 2.0                   |
| Reduction | 2-Butanone                    | 100                | NADH             | 100.0                 |
|           | Acetone                       | 100                | NADH             | 123.4                 |
|           | Acetophenone                  | 20                 | NADH             | 121.8                 |
|           | Propionaldehyde               | 100                | NADH             | 76.2                  |
|           | 4-Hydroxy-2-butanone          | 100                | NADH             | 41.2                  |
|           | 3-Hydroxy-3-methyl-2-butanone | 100                | NADH             | 18.5                  |

#### Example 7 (Inhibitor of secondary alcohol dehydrogenase)

After said enzyme was incubated at 30 °C for 30 min in the presence of various reagents, the remaining activity was assayed and expressed as the percentage relative to that (100%) of the untreated enzyme (Table 5).

Table 5

| Inhibitor                        | Concentration (mM) | Relative activity (%) |
|----------------------------------|--------------------|-----------------------|
| Phenylmethane sulfonyl fluoride  | 1                  | 69.0                  |
| p-Chloromercuribenzoic acid      | 0.05               | 0.0                   |
| N-Ethylmaleimide                 | 1                  | 21.2                  |
| Iodoacetic acid                  | 1                  | 52.0                  |
| Ethylenediamine tetraacetic acid | 1                  | 102.5                 |
| o-Phenanthroline                 | 1                  | 19.0                  |
| HgCl <sub>2</sub>                | 1                  | 0.0                   |
| CuSO <sub>4</sub>                | 1                  | 25.5                  |
| ZnCl <sub>2</sub>                | 1                  | 16.4                  |
| Dithiothreitol                   | 1                  | 0.0                   |
| b-Mercaptoethanol                | 1                  | 3.2                   |
| NH <sub>2</sub> OH               | 0.01               | 92.7                  |
| NaN <sub>3</sub>                 | 0.02(%)            | 89.9                  |
| Crotonic acid                    | 50                 | 89.6                  |

The enzyme activity was markedly inhibited by dithiothreitol (DTT), iodoacetamide, *p*-chloromercuribenzoic acid, mercuric chloride, zinc chloride, metal chelator (at high concentration) and 2-mercaptoethanol.

#### Example 8 (Analysis of the partial amino acid sequence of secondary alcohol dehydrogenase)

The purified enzyme (0.153 mg) in 50 mM Tris-HCl (pH 9.0) containing 4 M urea was digested with lysylendopeptidase (0.53  $\mu$ g) at 30°C for 6 h. Peptide fragments thus obtained were fractionated by a reversed phase HPLC (on a TSK ODS-120T column, TOSO), and eluted with a density gradient of acetonitrile in 0.1% trifluoroacetic acid. The amino acid sequence of fractionated peptides were determined by a protein sequencer 477A (ABI), and shown in Figs. 6, 7 and 8 (underlined).

#### Example 9 (PCR cloning of gene encoding secondary alcohol dehydrogenase)

A DNA fragment with the sequence deduced from the amino acid sequence near the N-terminal was synthesized, in consideration of its degeneracy, as a mixed PCR primer (CpN). Another DNA sequence complementary to that deduced from the amino acid sequence near the C-terminal was synthesized as another mixed PCR primer (CpT10). These base sequences are shown in Fig. 9. DNA synthesis was carried out with an ABI DNA synthesizer 381A.

#### Example 10 (Preparation of chromosomal DNA from *Candida parapsilosis*)

*Candida parapsilosis* IFO 1396 was grown in a YEPD medium (100 ml) (1% yeast extract, 2% polypeptone and 2% glucose) and centrifuged. Cells were suspended in 0.1 M ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) containing 25 mM sorbitol and centrifuged again. To the recovered cells suspended in 50 mM potassium phosphate (pH 7.5, 10 ml) containing 1 M sorbitol, 0.1 M 2-mercaptoethanol, chymolyase (0.4 ml) was added, and the mixture was incubated at 30°C to obtain protoplast. After the formation of protoplast was confirmed under the microscope, the mixture was centrifuged. To the recovered cells resuspended in 50 mM Tris-HCl (pH 7.4, 12 ml) containing 20 mM EDTA, 10% SDS (sodium dodecylsulfate, 1.2 ml) was added, thoroughly mixed, and incubated at 65°C for 80 min. Then, after the addition of 5 M potassium acetate (pH 5.0, 3.6 ml), the mixture was left on ice for 60 min to precipitate the denatured protein.

After removing the denatured protein by centrifugation, an equal volume of isopropanol was added to the recovered supernatant, and gently mixed. Precipitated DNA was collected by centrifugation, dried, dissolved in 10 mM Tris-HCl (pH 7.4) containing 1 mM EDTA. To this mixture, RNase (1 mg/ml, 0.75 ml) was added, and incubated at 37°C for 1 h to degrade contaminating RNA. Then after the successive extraction with phenol, phenol/chloroform, and phenol, DNA was recovered by ethanol precipitation and

used as the template for PCR described in Example 11.

#### Example 11 (Cloning of secondary alcohol dehydrogenase gene by PCR)

5 Using said chromosomal DNA of *Candida parapsilosis* (50 ng) prepared in Example 10 as the template, PCR was performed for amplification in a PCR buffer [10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM each dNTP, 0.01% gelatin, and 2 units TaqDNA polymerase (Roche)] with a set of said mixed PCR primers (CpN and CpT10, 100 pmol each) synthesized in Example 9. After 30 cycles of heat denaturation (94°C, 30 sec), annealing (45°C, 30 sec) and extension (60°C, 2 min), the PCR mixture was  
10 cooled to 4°C, and the amplification of DNA was confirmed by agarose-gel electrophoresis of the PCR products.

#### Example 12 (Subcloning of DNA amplified by PCR)

15 The DNA amplified by PCR in Example 11 was subcloned into pUC18 with a SureClone Ligation Kit (Pharmacia). The base sequence of the construct determined with an ABI DNA Sequencer 373A was found to consist of 971 bases including the sequence of said PCR primers, CpN and CpT10, which sandwiched said DNA sequence between them as shown in Figs. 6, 7 and 8. This sequence is designated as "core sequence" hereinafter.

#### Example 13 (Cloning of base sequence surrounding the core sequence by reversed PCR)

The base sequence complementary to a region near the 5'-side of the core sequence, CAATT-GACCCGCTTTGGGC (CPA-MUN) and that to a region near the 3'-side, TTCGAATCTTGGGATGTTTTTG  
25 (CPA-NSP) were synthesized as the reversed PCR primers. Regions of these primers in the DNA molecule encoding said secondary alcohol dehydrogenase are shown in Figs. 6, 7 and 8.

Chromosomal DNA of *Candida parapsilosis* was digested with a restriction enzyme HaeIII and the digest was self-circularized by T4 DNA ligase to be used as the template of reversed PCR.

30 PCR was performed in the PCR buffer (described in Example 11) containing auto-recircularization product (50 ng) and a set of said synthetic primers, CPN-MUN and CPA-NSP (20 pmol each). After 30 cycles of heat-denaturation (94°C, 30 sec), annealing (50°C, 30 sec) and extension reaction (70°C, 2 min), the amplified DNA fragment was subcloned into pUC18 with a SureClone Ligation Kit (Pharmacia) and then the entire base sequence was determined with an ABI DNA Sequencer as described in Example 12.

#### Example 14 (Synthesis of the gene encoding secondary alcohol dehydrogenase by PCR)

The restriction site was introduced to the DNA molecule encoding said enzyme by PCR with appropriate primers. Using said DNA prepared in Example 10 as the template, PCR was performed for amplification of a DNA fragment of about 1030 bp with a 5'-primer [CPA-ATG] (5'-TCGCGAATTCAATG-  
40 TCAATTCCATCAAGCCAG-3') having the EcoRI restriction site and a 3'-primer [CPA-TAG] (5'-AGATCT-TACTATGGATTAATAAACAACCTCTA-3') having the BglII restriction site. DNA was synthesized with an ABI DNA Synthesizer 381A as in Example 11.

#### Example 15 (Subcloning of DNA amplified by PCR)

45 The PCR fragment amplified as described in Example 14 was subcloned into the SmaI site of pUC18 having multicloning sites with SureClone Ligation Kit (Pharmacia) (Fig. 10). In the constructed plasmid (designated as pCPA6R), the lactose promoter was inserted in the opposite direction (included in the region designated as "lac Z" in Fig. 10).

#### Example 16 (Construction of plasmid pKK-CPA1, gene for the expression of secondary alcohol dehydrogenase)

55 Said gene of said secondary alcohol dehydrogenase was subcloned into the expression vector pKK223-3 (Pharmacia) by the following procedure and the construct was designated as pKK-CPA1. Said plasmid pCPA6R was digested by EcoI (Promega), linked with HindIII linker (Takara) and then cleaved with EcoRI (Takara) and HindIII (Takara) to extract the DNA fragment encoding said secondary alcohol dehydrogenase. Then said DNA fragment was linked to the cleaved product of the expression vector,

pKK223-3 with restriction enzymes EcoRI and HindIII to construct the gene expression vector for said secondary alcohol dehydrogenase, pKK-CPA1 (Fig. 11).

Example 17 (Production of said secondary alcohol dehydrogenase)

Competent cells of *Escherichia coli* JM109 were prepared and transformed with said expression vector pKK-CPA1 to produce a said secondary alcohol dehydrogenase producing strain. This strain was grown in an LB medium (consisting of 1% polypeptone, 0.5% yeast extract and 1.0% NaCl, pH 7.2) containing ampicillin (0.1 mg/ml) at 30 °C for 3 h. After the addition of isopropylthiogalactoside (IPTG) to a 1 mM final concentration, the culture was incubated for further 5 h, then the culture was centrifuged to collect cells.

Example 18 (Activity evaluation of transformed cells by enzymatic reaction)

The cells prepared according to Example 17 were suspended in 50 mM Tris-HCl (pH 9.0) containing 0.01% 2-mercaptoethanol, and sonicated to obtain the crude enzyme solution. Said enzyme solution was added to a reaction mixture consisting of 50 mM Tris-HCl (pH 9.0), 50 mM (S)-1,3-butanediol and 2.5 mM NAD<sup>+</sup>, and the rate of NAD<sup>+</sup> reduction was followed at 340 nm. Results of (S)-1,3-butanediol oxidizing activity thus assayed are shown in Table 6. As the control, results of similar activity assay of the host *Escherichia coli* cells which were not transformed with the expression plasmid pKK-CPA1 are also shown in Table 6.

Table 6

| Strain                                   | Specific activity (Unit/mg) |
|--|-----------------------------|
| <i>Escherichia coli</i> JM109 (pKK-CPA1) | 0.581                       |
| <i>Escherichia coli</i> JM109            | 0.0                         |

Example 19 (Production of (R)-1,3-butanediol by recombinant bacteria cells)

To the cells prepared according to Example 17, racemic 1,3-butanediol and CaCO<sub>3</sub> were added to a final concentration of 5% and 0.8% respectively, and the mixture was incubated in test tubes of 21-mm diameter at 30 °C for 17 h on shaking (250 rpm). Cell concentration at the beginning of reaction was adjusted to A<sub>650</sub> = 20. After the reaction, cells were removed by centrifugation, and the supernatant (500 µl) was saturated with NaCl, and then the remaining 1,3-butanediol was extracted with ethyl acetate (2 ml). After the removal of solvent from the extract, the residue was acetylated by the addition of acetyl chloride (100 µl). Acetylated 1,3-butanediol was dissolved in n-hexane (1 ml), and the optical purity was assayed by high performance liquid chromatography on an optical resolution column [Chiralcel OB (Daicel Chem. Ind.); solvent, n-hexane/2-propanol = 19/1; wave length, 220 nm; elution rate, 1.0 ml/min; temperature, 40 °C] (retention time: (S)-isomer, 15 min; (R)-isomer, 19.3 min).

Furthermore, after the supernatant described above was appropriately diluted with distilled water, the concentration of 1,3-butanediol therein was determined by gas chromatography [column (3 mm in diameter x 2.1 m in length), Thermo 3000 5%/chromosorb W 80 - 100 mesh (Shinwakako); temperature, 130 °C]. The optical purity and yield of 1,3-butanediol were summarized in Table 7. As the control, results of similar assay with the host *Escherichia coli* cells which were not transformed with the expression plasmid pKK-CPA1 were also listed in Table 7. Yield in Table 7 is "the molar ratio of the remaining 1,3-butanediol after the reaction to the initial racemic 1,3-butanediol added".

Table 7

| Strain                                   | Optical purity (%ee R) | Yield (%) |
|--|------------------------|-----------|
| <i>Escherichia coli</i> JM109 (pKK-CPA1) | 93.2                   | 48.3      |
| <i>Escherichia coli</i> JM109            | 0.0                    | 88.8      |

By the present invention it became possible to obtain a novel secondary alcohol dehydrogenase with stereochemical specificity, DNA encoding said enzyme, and microorganism transformed by DNA encoding said enzyme.

- Using said enzyme, the microorganism (including its mutant and transformant) producing said enzyme, or the processed products thereof, it became possible to produce an optically active alcohol from the racemic alcohol or asymmetric ketone.

## SEQUENCE LISTING

10

## (1) GENERAL INFORMATION:

## (i) APPLICANT:

15

- (A) NAME: Daicel Chemical Industries, Ltd.
- (B) STREET: 1, Teppo-cho, Sakai-shi
- (C) CITY: Osaka
- (E) COUNTRY: Japan
- (F) POSTAL CODE (ZIP): none

20

- (ii) TITLE OF INVENTION: A novel enzyme, a method to prepare said enzyme, a DNA segment encoding said enzyme, a transformant containing said DNA segment and a method of preparing optically active alcohol using said enzyme

- (iii) NUMBER OF SEQUENCES: 2

25

## (iv) COMPUTER READABLE FORM:

- (A) MEDIUM TYPE: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) OPERATING SYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (EPO)

30

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 1:

## (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

35

- (A) LENGTH: 1011 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

- (ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)

## (vi) ORIGINAL SOURCE:

40

- (A) ORGANISM: Candida parapsilosis

## (ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: CDS
- (B) LOCATION: 1..1011

45

## (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 1:

ATG TCA ATT CCA TCA AGC CAG TAC GGA TTC GTA TTC AAT AAG CAA TCA 48  
 Met Ser Ile Pro Ser Ser Gln Tyr Gly Phe Val Phe Asn Lys Gln Ser  
 1 5 10 15

50

GGA CTT AAT CTG AGA AAT GAT TTG CCT GTC CAC AAG CCC AAA GCG GGT 96  
 Gly Leu Asn Leu Arg Asn Asp Leu Pro Val His Lys Pro Lys Ala Gly  
 20 25 30

CAA TTG TTG TTG AAA GTT GAT GCT GTT GGA TTG TGT CAT TCT GAT TTA 144

55

|    |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|    | Gln | Leu | Leu | Leu | Lys | Val | Asp | Ala | Val | Gly | Leu | Cys | His | Ser | Asp | Leu |     |
|    |     | 35  |     |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |     |
| 5  | CAT | GTC | ATT | TAC | GAA | GGG | TTG | GAT | TGT | GGT | GAT | AAT | TAT | GTC | ATG | GGA | 192 |
|    | His | Val | Ile | Tyr | Glu | Gly | Leu | Asp | Cys | Gly | Asp | Asn | Tyr | Val | Met | Gly |     |
|    |     | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |     |
|    | CAT | GAA | ATT | GCT | GGA | ACT | GTT | GCT | GCT | GTG | GGT | GAT | GAT | GTC | ATT | AAC | 240 |
|    | His | Glu | Ile | Ala | Gly | Thr | Val | Ala | Ala | Val | Gly | Asp | Asp | Val | Ile | Asn |     |
|    |     | 65  |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     |     | 80  |     |
| 10 | TAC | AAG | GTT | GGT | GAT | CGT | GTT | GCC | TGT | GTC | GGA | CCC | AAT | GGA | TGT | GGT | 288 |
|    | Tyr | Lys | Val | Gly | Asp | Arg | Val | Ala | Cys | Val | Gly | Pro | Asn | Gly | Cys | Gly |     |
|    |     |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |     |
|    | GGG | TGC | AAG | TAT | TGT | CGT | GGT | GCC | ATT | GAC | AAT | GTA | TGT | AAA | AAC | GCA | 336 |
| 15 | Gly | Cys | Lys | Tyr | Cys | Arg | Gly | Ala | Ile | Asp | Asn | Val | Cys | Lys | Asn | Ala |     |
|    |     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |     |
|    | TTT | GGT | GAT | TGG | TTC | GGA | TTG | GGG | TAC | GAT | GGT | GGG | TAT | CAA | CAG | TAC | 384 |
|    | Phe | Gly | Asp | Trp | Phe | Gly | Leu | Gly | Tyr | Asp | Gly | Gly | Tyr | Gln | Gln | Tyr |     |
|    |     |     | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     | 125 |     |     |     |     |
| 20 | TTG | TTG | GTT | ACT | AGA | CCA | CGT | AAC | TTG | TCT | CGT | ATC | CCA | GAT | AAC | GTA | 432 |
|    | Leu | Leu | Val | Thr | Arg | Pro | Arg | Asn | Leu | Ser | Arg | Ile | Pro | Asp | Asn | Val |     |
|    |     |     | 130 |     |     |     | 135 |     |     |     |     | 140 |     |     |     |     |     |
|    | TCT | GCA | GAC | GTG | GCT | GCG | GCT | TCA | ACT | GAT | GCT | GTA | TTG | ACA | CCA | TAT | 480 |
| 25 | Ser | Ala | Asp | Val | Ala | Ala | Ala | Ser | Thr | Asp | Ala | Val | Leu | Thr | Pro | Tyr |     |
|    |     | 145 |     |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     |     |     |     | 160 |     |
|    | CAC | GCA | ATC | AAG | ATG | GCT | CAA | GTG | TCA | CCA | ACT | TCG | AAT | ATC | TTG | CTT | 528 |
|    | His | Ala | Ile | Lys | Met | Ala | Gln | Val | Ser | Pro | Thr | Ser | Asn | Ile | Leu | Leu |     |
|    |     |     |     |     | 165 |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     | 175 |     |     |
| 30 | ATT | GGT | GCT | GGT | GGA | TTG | GGT | GGA | AAT | GCA | ATT | CAA | GTT | GCC | AAG | GCA | 576 |
|    | Ile | Gly | Ala | Gly | Gly | Leu | Gly | Gly | Asn | Ala | Ile | Gln | Val | Ala | Lys | Ala |     |
|    |     |     |     | 180 |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |     |     |
|    | TTT | GGT | GCG | AAA | GTT | ACT | GTT | TTG | GAC | AAA | AAA | AAG | GAG | GCT | CGT | GAC | 624 |
| 35 | Phe | Gly | Ala | Lys | Val | Thr | Val | Leu | Asp | Lys | Lys | Lys | Glu | Ala | Arg | Asp |     |
|    |     |     | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |     |     |
|    | CAA | GCA | AAG | AAG | TTG | GGT | GCT | GAT | GCA | GTT | TAT | GAA | ACA | TTG | CCA | GAA | 672 |
|    | Gln | Ala | Lys | Lys | Leu | Gly | Ala | Asp | Ala | Val | Tyr | Glu | Thr | Leu | Pro | Glu |     |
|    |     |     | 210 |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |     |     |     |     |
| 40 | TCC | ATT | TCT | CCT | GGC | TCT | TTT | TCA | GCA | TGT | TTT | GAT | TTT | GTT | TCA | GTG | 720 |
|    | Ser | Ile | Ser | Pro | Gly | Ser | Phe | Ser | Ala | Cys | Phe | Asp | Phe | Val | Ser | Val |     |
|    |     |     |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |     |     |     | 240 |     |
|    | CAA | GCT | ACA |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |

50

55

816  
 ATT ATG CCC GTG GGA CTC GGT GCT CCT AAT TTA TCG TTT AAT TTG GGA  
 Ile Met Pro Val Gly Leu Gly Ala Pro Asn Leu Ser Phe Asn Leu Gly  
 260 265 270  
 5 GAT TTG GCA TTG AGA GAA ATT CGA ATC TTG GGT AGT TTT TGG GGA ACT 864  
 Asp Leu Ala Leu Arg Glu Ile Arg Ile Leu Gly Ser Phe Trp Gly Thr  
 275 280 285  
 ACT AAT GAT TTG GAT GAT GTT TTG AAA TTG GTT AGT GAA GGT AAA GTT 912  
 Thr Asn Asp Leu Asp Asp Val Leu Lys Leu Val Ser Glu Gly Lys Val  
 290 295 300  
 10 AAA CCC GTT GTG AGA AGT GCC AAA TTG AAG GAA TTG CCA GAG TAT ATT 960  
 Lys Pro Val Val Arg Ser Ala Lys Leu Lys Glu Leu Pro Glu Tyr Ile  
 305 310 315 320  
 15 GAA AAA TTG AGA AAC AAT GCT TAT GAA GGT AGA GTT GTT TTT AAT CCA 1008  
 Glu Lys Leu Arg Asn Asn Ala Tyr Glu Gly Arg Val Val Phe Asn Pro  
 325 330 335  
 TAG 1011  
 \*

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 2:

25 (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:  
 (A) LENGTH: 336 amino acids  
 (B) TYPE: amino acid  
 (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: protein

30 (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 2:

35 Met Ser Ile Pro Ser Ser Gln Tyr Gly Phe Val Phe Asn Lys Gln Ser  
 1 5 10 15  
 Gly Leu Asn Leu Arg Asn Asp Leu Pro Val His Lys Pro Lys Ala Gly  
 20 25 30  
 40 Gln Leu Leu Leu Lys Val Asp Ala Val Gly Leu Cys His Ser Asp Leu  
 35 40 45  
 His Val Ile Tyr Glu Gly Leu Asp Cys Gly Asp Asn Tyr Val Met Gly  
 50 55 60  
 55 His Glu Ile Ala Gly Thr Val Ala Ala Val Gly Asp Asp Val Ile Asn  
 65 70 75 80  
 Tyr Lys Val Gly Asp Arg Val Ala Cys Val Gly Pro Asn Gly Cys Gly  
 85 90 95  
 60 Gly Cys Lys Tyr Cys Arg Gly Ala Ile Asp Asn Val Cys Lys Asn Ala

50

55



|    |   |     |     |
|----|---|-----|-----|
|    | 100   | 105 | 110 |
|    | Phe Gly Asp Trp Phe Gly Leu Gly Tyr Asp Gly Gly Tyr Gln Gln Tyr |     |     |
|    | 115   | 120 | 125 |
| 5  | Leu Leu Val Thr Arg Pro Arg Asn Leu Ser Arg Ile Pro Asp Asn Val |     |     |
|    | 130   | 135 | 140 |
|    | Ser Ala Asp Val Ala Ala Ala Ser Thr Asp Ala Val Leu Thr Pro Tyr |     |     |
| 10 | 145   | 150 | 155 |
|    | His Ala Ile Lys Met Ala Gln Val Ser Pro Thr Ser Asn Ile Leu Leu |     |     |
|    | 165   | 170 | 175 |
|    | Ile Gly Ala Gly Gly Leu Gly Gly Asn Ala Ile Gln Val Ala Lys Ala |     |     |
| 15 | 180   | 185 | 190 |
|    | Phe Gly Ala Lys Val Thr Val Leu Asp Lys Lys Lys Glu Ala Arg Asp |     |     |
|    | 195   | 200 | 205 |
|    | Gln Ala Lys Lys Leu Gly Ala Asp Ala Val Tyr Glu Thr Leu Pro Glu |     |     |
| 20 | 210   | 215 | 220 |
|    | Ser Ile Ser Pro Gly Ser Phe Ser Ala Cys Phe Asp Phe Val Ser Val |     |     |
|    | 225   | 230 | 235 |
| 25 | Gln Ala Thr Phe Asp Val Cys Gln Lys Tyr Val Glu Pro Lys Gly Val |     |     |
|    | 245   | 250 | 255 |
|    | Ile Met Pro Val Gly Leu Gly Ala Pro Asn Leu Ser Phe Asn Leu Gly |     |     |
| 30 | 260   | 265 | 270 |
|    | Asp Leu Ala Leu Arg Glu Ile Arg Ile Leu Gly Ser Phe Trp Gly Thr |     |     |
|    | 275   | 280 | 285 |
|    | Thr Asn Asp Leu Asp Asp Val Leu Lys Leu Val Ser Glu Gly Lys Val |     |     |
| 35 | 290   | 295 | 300 |
|    | Lys Pro Val Val Arg Ser Ala Lys Leu Lys Glu Leu Pro Glu Tyr Ile |     |     |
|    | 305   | 310 | 315 |
| 40 | Glu Lys Leu Arg Asn Asn Ala Tyr Glu Gly Arg Val Val Phe Asn Pro |     |     |
|    | 325   | 330 | 335 |

## 45 Claims

1. An enzyme with the following physicochemical properties 1) to 3):

## 1) Functions

Said enzyme produces aldehydes or ketones through the oxidation of alcohols with NAD<sup>+</sup> -  
 50 [nicotinamide adenine dinucleotide (oxidized)] as the coenzyme. Contrarily the enzyme produces  
 alcohols through the reduction of ketones or aldehydes with NADH (nicotinamide adenine  
 dinucleotide (reduced)) as the coenzyme.

## 2) Substrate specificity

Said enzyme oxidizes aliphatic alcohols including those with the aromatic substitution and shows  
 55 a higher activity towards the secondary alcohols than the primary ones, oxidizing (S)-2-butanol  
 preferentially. Said enzyme also reduces aldehydes and aliphatic ketones with aromatic substitu-  
 tions.

## 3) Molecular weight

The apparent molecular weight of said enzyme was estimated to be about 40,000 by SDS-PAGE.

- 5 2. The preparative method of said enzyme as described in Claim 1 from the culture medium of the microorganism belonging to genus *Candida* which produces said enzyme.
3. In the method as described in Claim 2, the microorganism belonging to genus *Candida* is *Candida parapsilosis*.
- 10 4. A DNA segment encoding said enzyme as described in Claim 1.
5. The DNA sequence according to Claim 4 wherein said segment essentially has a base sequence encoding the proteins as defined in Figs. 6, 7, and 8.
- 15 6. The DNA segment according to Claim 5 wherein said segment has a base sequence encoding the proteins as defined in Figs. 6, 7, and 8.
- 20 7. The DNA segment according to Claim 5 wherein said segment contains a base sequence encoding the proteins wherein the amino acid sequence as defined in Figs. 6, 7, and 8 is modified by the substitution, insertion or deletion of certain amino acids.
8. A vector comprising either of said DNAs according to Claims 4 to 7.
- 25 9. A microorganism stably transformed with either of said DNAs according to Claims 4 to 7.
10. A method of producing said enzyme according to Claim 1 comprising culturing said microorganism as described in Claim 9 and isolating said enzyme as described in Claim 1 from the culture.
- 30 11. A method of producing alcohol comprising reacting ketone or aldehyde with said enzyme according to Claim 1 or with said microorganism producing said enzyme or processed product thereof and reducing said ketone or aldehyde to alcohol.
- 35 12. A method of producing an optically active alcohol comprising reacting asymmetric ketone with said enzyme according to Claim 1 or with said microorganism producing said enzyme or processed product thereof and reducing said ketone to an optically active alcohol.
- 40 13. A method of producing ketone or aldehyde comprising reacting alcohol with said enzyme according to Claim 1 or with said microorganism producing said enzyme or processed product thereof and oxidizing said alcohol to ketone or aldehyde.
- 45 14. A method of producing an optically active alcohol comprising reacting racemic alcohol with said enzyme according to Claim 1 or with said microorganism producing said enzyme or processed product thereof and oxidizing either of optically active isomers preferentially to isolate the remaining optically active alcohol.
- 50 15. Either of methods according to Claims 11 to 14 comprising utilizing said enzyme derived from microorganism as described in Claim 9 or said microorganism as described in Claim 9 or processed product thereof.

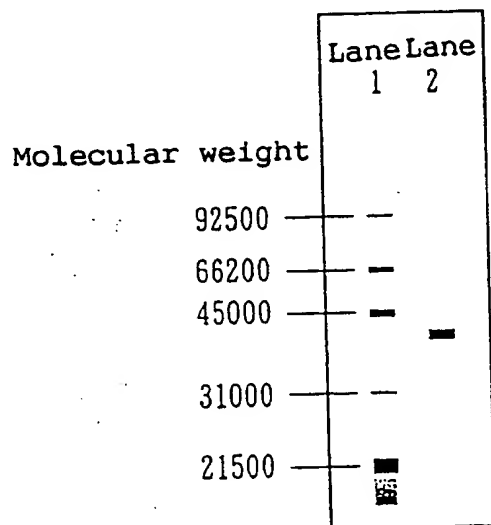


FIG. 1

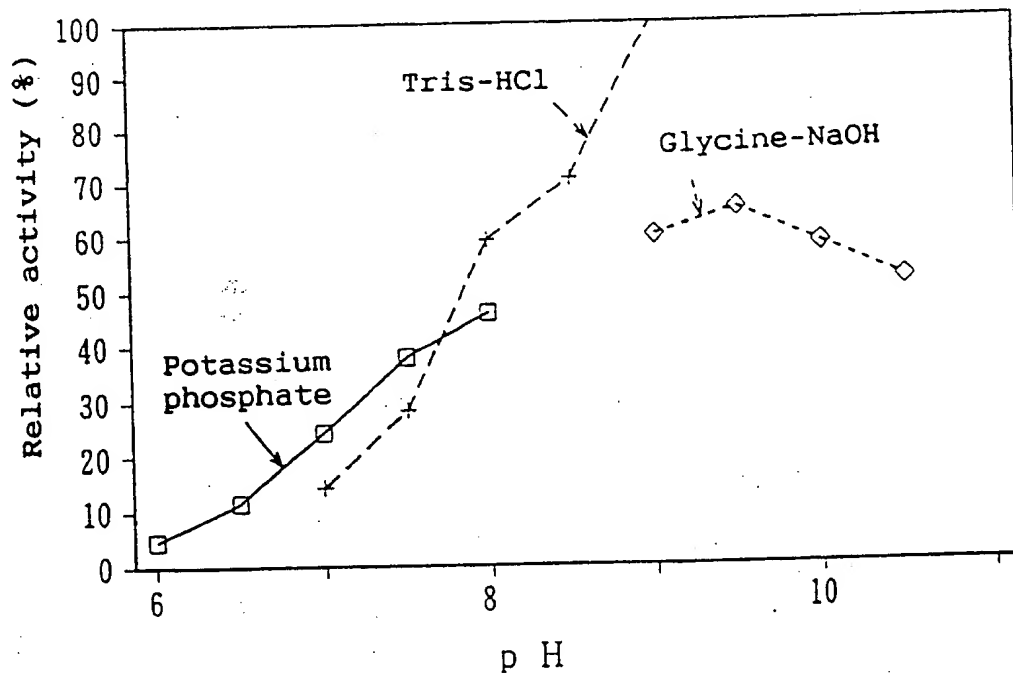


FIG. 2

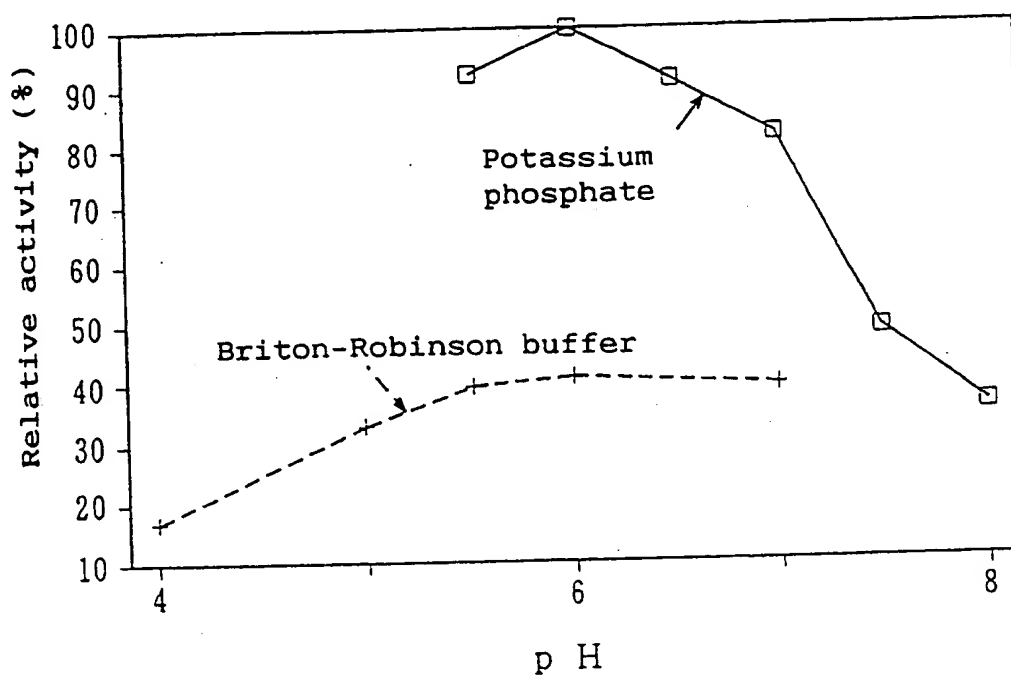


FIG. 3

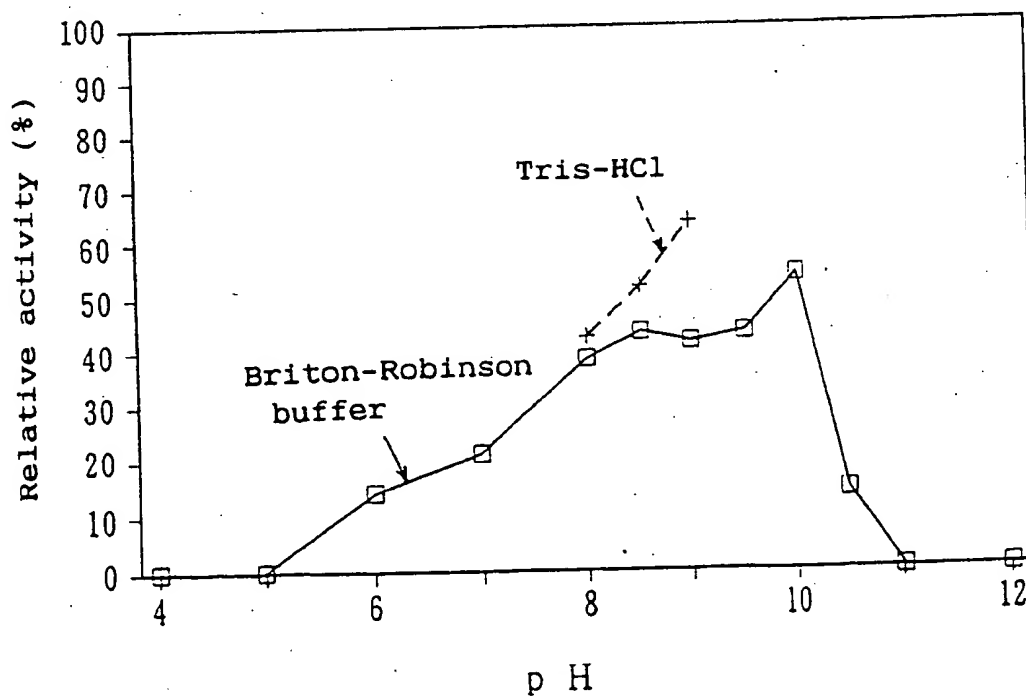
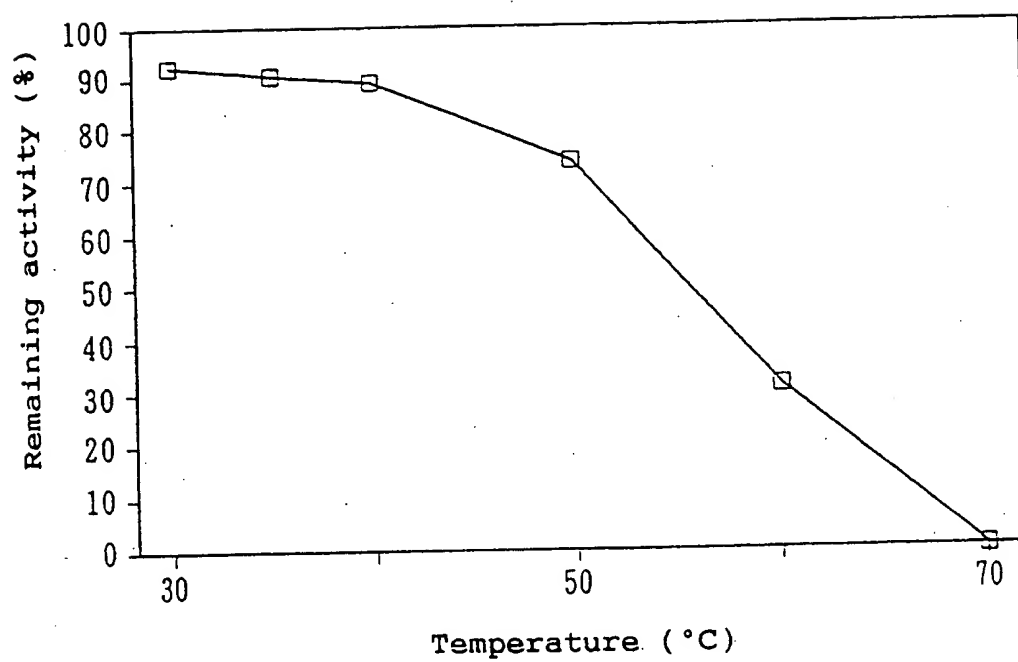


FIG. 4

*FIG. 5*

DNA encoding said secondary alcohol dehydrogenase

10 20 30 40 50 60  
 ATGTCAATTCCATCAAGCCAGTACGGATTTCGTATTCAATAAGCAATCAGGACTTAATCTG  
MetSerIleProSerSerGlnTyrGlyPheValPheAsnLysGlnSerGlyLeuAsnLeu

CpN →

70 80 90 100 110 120  
 AGAAATGATTGCTGTCCACAAGCCCAAAGCGGGTCAATTGTTGTTGAAAGTTGATGCT  
ArgAsnAspLeuProValHisLysProLysAlaGlyGlnLeuLeuLeuLysValAspAla

← CPA-MUN

130 140 150 160 170 180  
 GTTGGATTGTGTCATTCTGATTTACATGTCATTTACGAAGGGTTGGATTGTGGTGATAAT  
ValGlyLeuCysHisSerAspLeuHisValIleTyrGluGlyLeuAspCysGlyAspAsn

190 200 210 220 230 240  
 TATGTCATGGGACATGAAATTGCTGGAAGTGTGCTGCTGCGGTGATGATGTCATTAAC  
TyrValMetGlyHisGluIleAlaGlyThrValAlaAlaValGlyAspAspValIleAsn

250 260 270 280 290 300  
 TACAAGGTTGGTGATCGTGTTCCTGTGTCGGACCCAATGGATGTGGTGGGTGCAAGTAT  
TyrLysValGlyAspArgValAlaCysValGlyProAsnGlyCysGlyGlyCysLysTyr

310 320 330 340 350 360  
 TGTCTGCTGCCATTGACAATGTATGTAAAAACGCATTTGGTGATTGGTTCCGATTGGGG  
CysArgGlyAlaIleAspAsnValCysLysAsnAlaPheGlyAspTrpPheGlyLeuGly

FIG. 6

370 380 390 400 410 420  
TACGATGGTGGGTATCAACAGTACTTGTGGTTACTAGACCACGTAACCTGTCTCGTATC  
TyrAspGlyGlyTyrGlnGlnTyrLeuLeuValThrArgProArgAsnLeuSerArgIle

430 440 450 460 470 480  
CCAGATAACGTATCTGCAGACGTGGCTGCGGCTTCAACTGATGCTGTATTGACACCATAT  
ProAspAsnValSerAlaAspValAlaAlaAlaSerThrAspAlaValLeuThrProTyr

490 500 510 520 530 540  
CACGCAATCAAGATGGCTCAAGTGTCACCAACTTCGAATATCTTGCTTATTGGTGCTGGT  
HisAlaIleLysMetAlaGlnValSerProThrSerAsnIleLeuLeuIleGlyAlaGly

550 560 570 580 590 600  
GGATTGGGTGGAAATGCAATTCAAGTTGCCAAGGCATTTGGTGCGAAAGTTACTGTTTTG  
GlyLeuGlyGlyAsnAlaIleGlnValAlaLysAlaPheGlyAlaLysValThrValLeu

610 620 630 640 650 660  
GACAAAAAAGGAGGCTCGTGACCAAGCAAAGAAGTTGGGTGCTGATGCAGTTTATGAA  
AspLysLysLysGluAlaArgAspGlnAlaLysLysLeuGlyAlaAspAlaValTyrGlu

670 680 690 700 710 720  
ACATTGCCAGAATCCATTCTCCTGGCTCTTTTTCAGCATGTTTGATTTGTTTCAGTG  
ThrLeuProGluSerIleSerProGlySerPheSerAlaCysPheAspPheValSerVal

730 740 750 760 770 780  
CAAGCTACATTTGATGTATGTCAAAGTATGTTGAACCAAAGGGTGTAAATTATGCCCGTG  
GlnAlaThrPheAspValCysGlnLysTyrValGluProLysGlyValIleMetProVal

790            800            810            820            830            840  
 GGA CTCGGT GCTCCTAATTTATCGTTTAATTTGGGAGATTGGCATTGAGAGAAATTCGA  
 GlyLeuGlyAlaProAsnLeuSerPheAsnLeuGlyAspLeuAlaLeuArgGluIleArg

850            860            870            880            890            900  
 ATCTTGGGTAGTTTTTGGGGA ACTACTAATGATTTGGATGATGTTTTGAAATTGGTTAGT  
 IleLeuGlySerPheTrpGlyThrThrAsnAspLeuAspAspValLeuLysLeuValSer  
CPA-NSP →

910            920            930            940            950            960  
 GAAGGTAAAGTTAAACCCGTTGTGAGAAGTGCCAAATTGAAGGAATTGCCAGAGTATATT  
GluGlyLysValLysProValValArgSerAlaLysLeuLysGluLeuProGluTyrIle

970            980            990            1000            1010  
 GAAAAATTGAGAAACAATGCTTATGAAGGTAGAGTTGTTTTTAATCCATAG  
GluLysLeuArgAsnAsnAlaTyrGluGlyArgValValPheAsnPro\*\*\*

← CpT10

*FIG. 8*



(C p N)

Amino acid  
sequence : Tyr-Gly-Phe-Val-Phe-Asn-Lys-Gln

DNA sequence : 5' TAT-GGT-TTT-GTT-TTT-AAT-AAA-CA 3'

|         |   |   |   |   |   |   |   |
|---------|---|---|---|---|---|---|---|
| (C p N) | C | C | C | C | C | C | G |
|         |   | A |   | A |   |   |   |
|         |   | G |   | G |   |   |   |

(C p T 1 0)

Amino acid  
sequence : Asn-Asn-Ala-Tyr-Glu-Gly-Arg

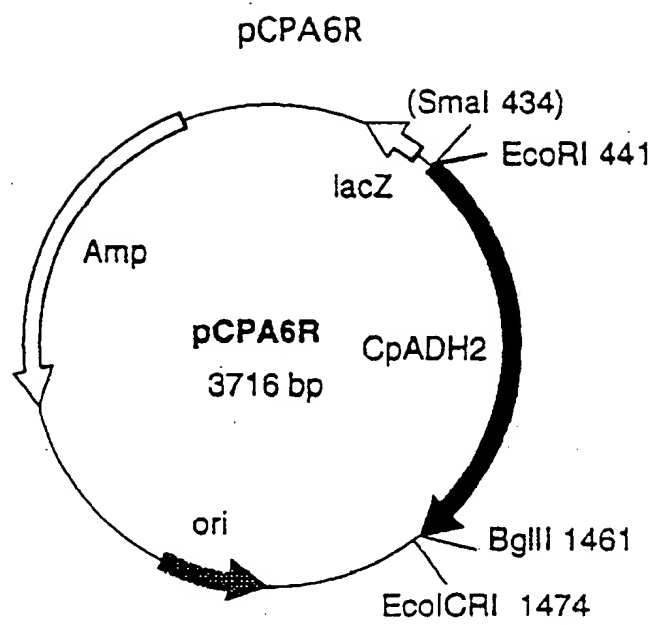
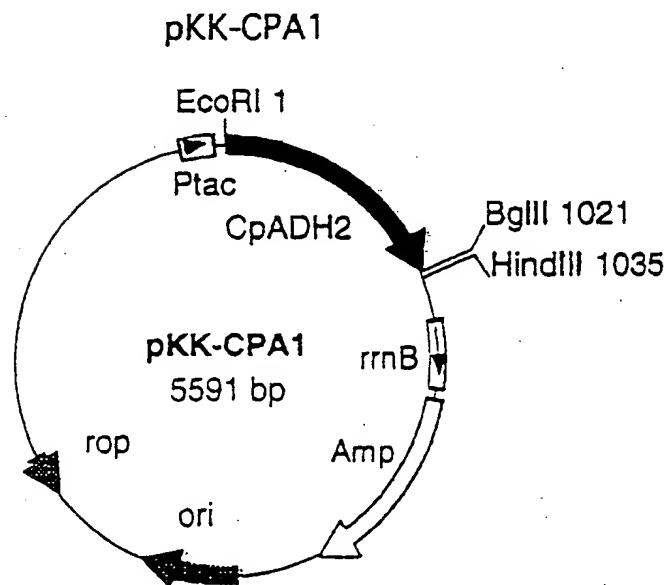
DNA sequence : 5' AAT-AAT-GCT-TAT-GAA-GGT-CG 3'

|   |   |   |   |   |   |   |
|---|---|---|---|---|---|---|
| C | C | C | C | G | C | A |
|   |   | A |   |   | A |   |
|   |   | G |   |   | G |   |

Complementary  
sequence : 3' TTA-TTA-CGA-ATA-CTT-CCA-GC 5'

|             |   |   |   |   |   |   |   |
|-------------|---|---|---|---|---|---|---|
| (C p T 1 0) | G | G | G | G | C | G | T |
|             |   |   | T |   |   | T |   |
|             |   |   | C |   |   | C |   |

FIG. 9

*FIG. 10**FIG. 11*

(19)



Europäisches Patentamt

European Patent Office

Office européen des brevets



(11)

EP 0 645 453 A3

(12)

## EUROPEAN PATENT APPLICATION

(88) Date of publication A3:  
26.03.1997 Bulletin 1997/13

(43) Date of publication A2:  
29.03.1995 Bulletin 1995/13

(21) Application number: 94115138.3

(22) Date of filing: 26.09.1994

(51) Int. Cl.<sup>6</sup>: C12N 15/53, C12N 9/04,  
C12N 1/21, C12N 15/70,  
C12P 7/24, C12P 7/04,  
C12P 41/00

(84) Designated Contracting States:  
DE FR GB IT NL

(30) Priority: 24.09.1993 JP 261649/93  
28.12.1993 JP 337191/93  
02.08.1994 JP 181308/94

(71) Applicant: DAICEL CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.  
Sakai-shi, Osaka (JP)

(72) Inventors:  
• Kojima, Tomoko  
Tsukuba-shi, Ibaraki (JP)

• Yamamoto, Hiroaki  
Tsukuba-shi, Ibaraki (JP)  
• Kawada, Naoki  
Tsukuba-shi, Ibaraki (JP)  
• Matsuyama, Akinobu  
Arai-shi, Niigata (JP)

(74) Representative: KUHNEN, WACKER & PARTNER  
Alois-Steinecker-Strasse 22  
85354 Freising (DE)

(54) Alcohol de hydrogenase, DNA encoding it, preparation and method of preparing optically active alcohols

(57) [Object]

The present invention provides a novel secondary alcohol dehydrogenase useful for the synthesis of optically active alcohol and DNA encoding said enzyme. A microorganism belonging to genus *Candida* was found to produce a novel secondary alcohol dehydrogenase with a high stereochemical specificity. Using said enzyme, optically active alcohols were prepared, and by cloning of DNA encoding said enzyme, the base sequence of said DNA was determined. By providing a novel secondary alcohol dehydrogenase with a high stereochemical specificity and the gene encoding said enzyme, an efficient production of optically active alcohols became possible.

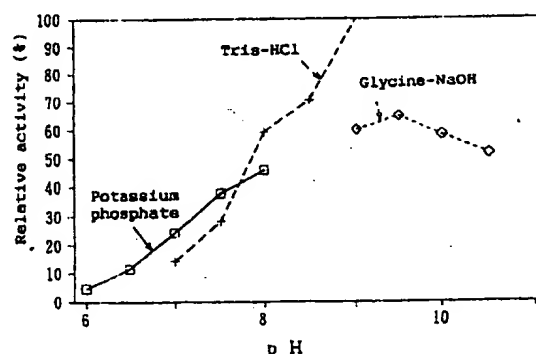


FIG. 2



European Patent  
Office

# EUROPEAN SEARCH REPORT

Application Number  
EP 94 11 5138

| DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT  |  |   |   |
|--|--|---|---|
| Category   | Citation of document with indication, where appropriate, of relevant passages  | Relevant to claim   | CLASSIFICATION OF THE APPLICATION (Int.Cl.6)  |
| X  | WO 93 18138 A (FORSCHUNGSZENTRUM JÜLICH GMBH) 16 September 1993<br>* page 1, paragraph 6 - page 3, paragraph 3 *<br>* page 3, paragraph 6 *<br>* page 6, paragraph 1 - page 9, paragraph 2 *<br>* page 13, paragraph 3 - page 16, paragraph 3; table 5 *   | 1-3,<br>11-14   | C12N15/53<br>C12N9/04<br>C12N1/21<br>C12N15/70<br>C12P7/24<br>C12P7/04<br>C12P41/00 |
| D,X  | ---<br>JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 268, no. 11, 15 April 1993, MD US, pages 7792-7798, XP002024200<br>DAVID W. GREEN ET AL.: "Inversion of the substrate specificity of yeast alcohol dehydrogenase"<br>* page 7795, left-hand column, paragraph 2 *<br>* page 7795, right-hand column, paragraph 3 - paragraph 4; table V *                                   | 1,11-14   |   |
| D,A  | ---<br>JOURNAL OF ORGANIC CHEMISTRY, vol. 57, no. 5, 28 February 1992, EASTON US, pages 1526-1532, XP002024201<br>CURT W. BRADSHAW ET AL.: "A Pseudomonas sp. alcohol dehydrogenase with broad substrate specificity and unusual stereospecificity for organic synthesis"<br>* page 1526, left-hand column, paragraph 1 - page 1529, right-hand column, last paragraph * | 1-15  | TECHNICAL FIELDS SEARCHED (Int.Cl.6)<br>C12N<br>C12P                                |
| The present search report has been drawn up for all claims   |  |   |   |
| Place of search<br>THE HAGUE   |  | Date of completion of the search<br>30 January 1997   | Examiner<br>Montero Lopez, B  |
| CATEGORY OF CITED DOCUMENTS<br>X : particularly relevant if taken alone<br>Y : particularly relevant if combined with another document of the same category<br>A : technological background<br>O : non-written disclosure<br>P : intermediate document |  | T : theory or principle underlying the invention<br>E : earlier patent document, but published on, or after the filing date<br>D : document cited in the application<br>L : document cited for other reasons<br>-----<br>& : member of the same patent family, corresponding document |   |

|   |           |   |
|---|-----------|---|
| <b>(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> :</b><br><br><b>C12N 15/53, C12P 7/42, 7/62, 11/00, 13/02</b>  | <b>A1</b> | <b>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/42590</b><br><br><b>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 26. August 1999 (26.08.99)</b>   |
| <b>(21) Internationales Aktenzeichen:</b> PCT/EP99/01017<br><br><b>(22) Internationales Anmeldedatum:</b> 18. Februar 1999 (18.02.99)<br><br><b>(30) Prioritätsdaten:</b><br>388/98                      18. Februar 1998 (18.02.98)                      CH<br><br><b>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US):</b> LONZA AG [CH/CH]; (Geschäftsleitung: 4002 Basel), CH-3945 Gampel (CH).<br><br><b>(72) Erfinder; und</b><br><b>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US):</b> PETERSEN, Michael [DE/CH]; Sandstrasse 7, CH-3930 Visp (CH). BIRCH, Olwen [GB/CH]; Weingartenweg 16, CH-3930 Visp (CH). SHIMIZU, Sakayu [JP/JP]; Kyoto University, Sakyo-Ku, Kyoto 606-8502 (JP). KIENER, Andreas [CH/CH]; Meisenweg 5, CH-3930 Visp (CH). HISCHIER, Marie-Luise [CH/CH]; Sandstrasse 1, CH-3930 Visp (CH). THÖNI, Susanne [CH/CH]; Bahnhofstrasse 3, CH-3904 Naters (CH).<br><br><b>(74) Anwälte:</b> RITTHALER, Wolfgang usw.; Winter, Brandl & Partner, Alois-Steinecker-Strasse 22, D-85354 Freising (DE). |           | <b>(81) Bestimmungsstaaten:</b> AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).<br><br><b>Veröffentlicht</b><br>Mit internationalem Recherchenbericht.<br>Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.<br>Mit Angaben über hinterlegtes biologisches Material, eingereicht gemäss Regel 13bis getrennt von der Beschreibung. |

**(54) Title:** METHOD FOR PRODUCING TRIFLUORO-3(R)-HYDROXYBUTYRIC ACID DERIVATIVES

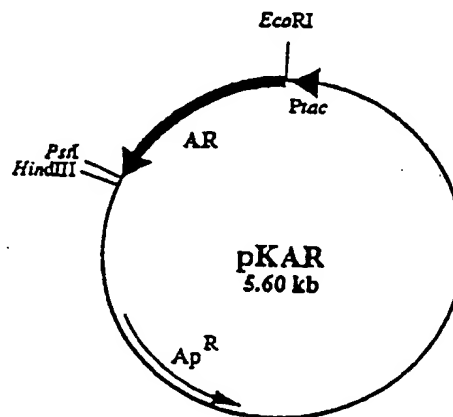
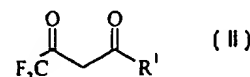
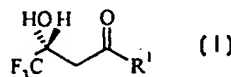
**(54) Bezeichnung:** VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON TRIFLUOR-3(R)-HYDROXYBUTTERSÄUREDERIVATEN

**(57) Abstract**

The invention relates to a biotechnological method for producing trifluoro-3(R)-hydroxybutyric acid derivatives of the general formula (I), where R<sup>1</sup> represents -OR<sup>2</sup>, where R<sup>2</sup> is hydrogen, C<sub>1-10</sub> alkyl, C<sub>1-10</sub> alkenyl, C<sub>3-8</sub> cycloalkyl, aryl, alkoxyalkyl or alkoxyalkoxyalkyl; -NR<sup>3</sup>R<sup>4</sup>, where R<sup>3</sup> and R<sup>4</sup> are the same or different and represent hydrogen, C<sub>1-10</sub> alkyl, C<sub>1-10</sub> alkenyl, C<sub>3-8</sub> cycloalkyl or aryl; or -SR<sup>5</sup>, where R<sup>5</sup> represents hydrogen, C<sub>1-10</sub> alkyl, C<sub>1-10</sub> alkenyl, aryl or C<sub>3-8</sub> cycloalkyl, based on a trifluoroacetoacetic acid derivative of the general formula (II), where R<sup>1</sup> has the meaning given above, by means of micro-organisms which are able to reduce a carbonyl function or by means of a cell-free enzyme extract of said micro-organisms.

**(57) Zusammenfassung**

Beschrieben wird ein biotechnologisches Verfahren zur Herstellung von Trifluor-3(R)-hydroxybuttersäurederivaten der allgemeinen Formel (I), worin R<sup>1</sup>-OR<sup>2</sup>, worin R<sup>2</sup> Wasserstoff, C<sub>1-10</sub>-Alkyl, C<sub>1-10</sub>-Alkenyl, C<sub>3-8</sub> Cycloalkyl, Aryl, Alkoxyalkyl oder Alkoxyalkoxyalkyl ist, -NR<sup>3</sup>R<sup>4</sup>, worin R<sup>3</sup> und R<sup>4</sup> gleich oder verschieden sind und für Wasserstoff, C<sub>1-10</sub>-Alkyl, C<sub>1-10</sub>-Alkenyl, C<sub>3-8</sub>-Cycloalkyl oder Aryl stehen, oder -SR<sup>5</sup>, worin R<sup>5</sup> Wasserstoff, C<sub>1-10</sub>-Alkyl, C<sub>1-10</sub>-Alkenyl, Aryl oder C<sub>3-8</sub>-Cycloalkyl ist, bedeutet, ausgehend von einem Trifluoroacessigsäurederivat der allgemeinen Formel (II), worin R<sup>1</sup> die genannte Bedeutung hat, mittels Mikroorganismen, die befähigt sind, eine Carbonylfunktion zu reduzieren oder mittels einem zellfreien Enzymextrakt dieser Mikroorganismen.



### LEDIGLICH ZUR INFORMATION

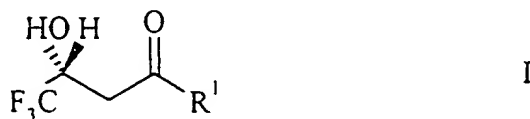
Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

|    |                              |    |                                   |    |   |    |                                |
|----|------------------------------|----|-----------------------------------|----|---|----|--------------------------------|
| AL | Albanien                     | ES | Spanien                           | LS | Lesotho   | SI | Slowenien                      |
| AM | Armenien                     | FI | Finnland                          | LT | Litauen   | SK | Slowakei                       |
| AT | Österreich                   | FR | Frankreich                        | LU | Luxemburg                                       | SN | Senegal                        |
| AU | Australien                   | GA | Gabun                             | LV | Lettland  | SZ | Swasiland                      |
| AZ | Aserbaidshan                 | GB | Vereinigtes Königreich            | MC | Monaco  | TD | Tschad                         |
| BA | Bosnien-Herzegowina          | GE | Georgien                          | MD | Republik Moldau                                 | TG | Togo                           |
| BB | Barbados                     | GH | Ghana                             | MG | Madagaskar                                      | TJ | Tadschikistan                  |
| BE | Belgien                      | GN | Guinea                            | MK | Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien | TM | Turkmenistan                   |
| BF | Burkina Faso                 | GR | Griechenland                      |    |   | TR | Türkei                         |
| BG | Bulgarien                    | HU | Ungarn                            | ML | Mali  | TT | Trinidad und Tobago            |
| BJ | Benin                        | IE | Irland                            | MN | Mongolei  | UA | Ukraine                        |
| BR | Brasilien                    | IL | Israel                            | MR | Mauretanien                                     | UG | Uganda                         |
| BY | Belarus                      | IS | Island                            | MW | Malawi  | US | Vereinigte Staaten von Amerika |
| CA | Kanada                       | IT | Italien                           | MX | Mexiko  | UZ | Usbekistan                     |
| CF | Zentralafrikanische Republik | JP | Japan                             | NE | Niger   | VN | Vietnam                        |
| CG | Kongo                        | KE | Kenia                             | NL | Niederlande                                     | YU | Jugoslawien                    |
| CH | Schweiz                      | KG | Kirgisistan                       | NO | Norwegen  | ZW | Zimbabwe                       |
| CI | Côte d'Ivoire                | KP | Demokratische Volksrepublik Korea | NZ | Neuseeland                                      |    |                                |
| CM | Kamerun                      |    |                                   | PL | Polen   |    |                                |
| CN | China                        | KR | Republik Korea                    | PT | Portugal  |    |                                |
| CU | Kuba                         | KZ | Kasachstan                        | RO | Rumänien  |    |                                |
| CZ | Tschechische Republik        | LC | St. Lucia                         | RU | Russische Föderation                            |    |                                |
| DE | Deutschland                  | LI | Liechtenstein                     | SD | Sudan   |    |                                |
| DK | Dänemark                     | LK | Sri Lanka                         | SE | Schweden  |    |                                |
| EE | Estland                      | LR | Liberia                           | SG | Singapur  |    |                                |

## Verfahren zur Herstellung von Trifluor-3(R)-hydroxybuttersäurederivaten

Die Erfindung betrifft ein neues biotechnologisches Verfahren zur Herstellung von Trifluor-3(R)-hydroxybuttersäurederivaten der allgemeinen Formel

5



Trifluor-3(R)-hydroxybuttersäurederivate wie 4,4,4-Trifluor-3(R)-hydroxybuttersäureethylester sind wichtige Zwischenprodukte zur Herstellung von Pharmazeutika wie  
10 beispielsweise zur Herstellung von Befloxatone, einem Monoaminoxidase-A-Inhibitor (EP-A-0 736 606).

Zur Herstellung von 4,4,4-Trifluor-3(R)-hydroxybuttersäureester sind bereits mehrere biotechnologisches Verfahren bekannt.

15 Guerrero, A. & Raja, E. (Bioorganic Chemistry Letters 1(12), 675 – 678) beschreiben ein mikrobiologisches Verfahren zur Herstellung von 4,4,4-Trifluor-3(R)-hydroxybuttersäureethylester ausgehend von dem entsprechenden Racemat mittels *Saccharomyces cerevisiae*. Dabei wird das gewünschte Produkt in schlechter Enantiomeren-Reinheit erhalten.

Die EP-A-0 736 606 beschreibt ein biotechnologisches Verfahren zur Herstellung von  
20 4,4,4-Trifluor-3(R)-hydroxybuttersäureethylester, ausgehend von 4,4,4-Trifluor-3-hydroxybuttersäureethylester mittels der Lipase Novozym 435. Nachteilig bei diesem Verfahren ist die mässige Ausbeute an dem gewünschten Produkt.

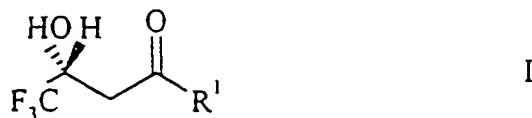
Die EP-A-0 577 446 umfasst ein biotechnologisches Verfahren zur Herstellung von optisch  
25 aktivem 4,4,4-Trifluor-3-hydroxybuttersäureethylester, ausgehend von dem entsprechenden racemischen Ester mittels Lipasen. Nach diesem Verfahren wird das Produkt in geringer Ausbeute und in schlechter optischer Reinheit erhalten.

Die WO 89/02 470 beschreibt ein Verfahren zur Herstellung von 4,4,4-Trifluor-3(R)-  
30 hydroxybuttersäureethylester, ausgehend von racemischem 4,4,4-Trifluor-3-acyloxy-

## Verfahren zur Herstellung von Trifluor-3(R)-hydroxybuttersäurederivaten

Die Erfindung betrifft ein neues biotechnologisches Verfahren zur Herstellung von Trifluor-3(R)-hydroxybuttersäurederivaten der allgemeinen Formel

5



Trifluor-3(R)-hydroxybuttersäurederivate wie 4,4,4-Trifluor-3(R)-hydroxybuttersäureethylester sind wichtige Zwischenprodukte zur Herstellung von Pharmazeutika wie  
10 beispielsweise zur Herstellung von Befloxatone, einem Monoaminoxidase-A-Inhibitor (EP-A-0 736 606).

Zur Herstellung von 4,4,4-Trifluor-3(R)-hydroxybuttersäureester sind bereits mehrere biotechnologisches Verfahren bekannt.

15 Guerrero, A. & Raja, E. (Bioorganic Chemistry Letters 1(12), 675 – 678) beschreiben ein mikrobiologisches Verfahren zur Herstellung von 4,4,4-Trifluor-3(R)-hydroxybuttersäureethylester ausgehend von dem entsprechenden Racemat mittels *Saccharomyces cerevisiae*. Dabei wird das gewünschte Produkt in schlechter Enantiomeren-Reinheit erhalten.

Die EP-A-0 736 606 beschreibt ein biotechnologisches Verfahren zur Herstellung von  
20 4,4,4-Trifluor-3(R)-hydroxybuttersäureethylester, ausgehend von 4,4,4-Trifluor-3-hydroxybuttersäureethylester mittels der Lipase Novozym 435. Nachteilig bei diesem Verfahren ist die mässige Ausbeute an dem gewünschten Produkt.

Die EP-A-0 577 446 umfasst ein biotechnologisches Verfahren zur Herstellung von optisch  
25 aktivem 4,4,4-Trifluor-3-hydroxybuttersäureethylester, ausgehend von dem entsprechenden racemischen Ester mittels Lipasen. Nach diesem Verfahren wird das Produkt in geringer Ausbeute und in schlechter optischer Reinheit erhalten.

Die WO 89/02 470 beschreibt ein Verfahren zur Herstellung von 4,4,4-Trifluor-3(R)-  
30 hydroxybuttersäureethylester, ausgehend von racemischem 4,4,4-Trifluor-3-acyloxy-



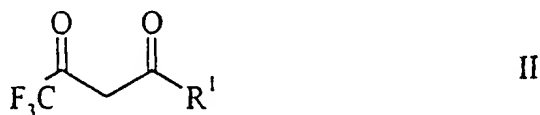
buttersäureethylester mittels hydrolytischen Enzymen. Dabei wird jedoch das entsprechende Produkt nicht in enantiomerenreiner Form erhalten.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es, ein biotechnologisches Verfahren zur Herstellung von 4,4,4-Trifluor-3(R)-hydroxybuttersäurederivaten zur Verfügung zu stellen, mit welchem das gewünschte Produkt in guter optischer Reinheit und mit guter Ausbeute isoliert werden kann.

Diese Aufgabe wird mit dem Verfahren nach Anspruch 1 gelöst.

10

Erfindungsgemäss wird das Verfahren derart durchgeführt, dass man ein Trifluoracetessigsäurederivat der allgemeinen Formel



15

worin

$\text{R}^1$   $-\text{OR}^2$ , worin  $\text{R}^2$  Wasserstoff,  $\text{C}_{1-10}$ -Alkyl,  $\text{C}_{1-10}$ -Alkenyl,  $\text{C}_{3-8}$ -Cycloalkyl, Aryl, Alkoxyalkyl oder Alkoxyalkoxyalkyl ist,

$-\text{NR}^3\text{R}^4$ , worin  $\text{R}^3$  und  $\text{R}^4$  gleich oder verschieden sind und für Wasserstoff,  $\text{C}_{1-10}$ -Alkyl,

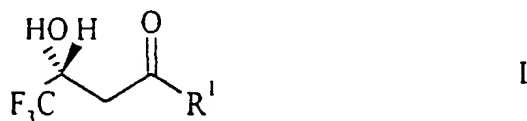
20

$\text{C}_{1-10}$ -Alkenyl,  $\text{C}_{3-8}$ -Cycloalkyl oder Aryl stehen, oder

$-\text{SR}^5$ , worin  $\text{R}^5$  Wasserstoff,  $\text{C}_{1-10}$ -Alkyl,  $\text{C}_{1-10}$ -Alkenyl, Aryl oder  $\text{C}_{3-8}$ -Cycloalkyl ist, bedeutet,

mittels Mikroorganismen, die befähigt sind eine Carbonylfunktion zu reduzieren oder mittels einem zellfreien Enzymextrakt dieser Mikroorganismen, in die Verbindung der allgemeinen Formel

25



worin  $R^1$  die genannte Bedeutung hat, überführt.

Als  $C_{1-10}$ -Alkyl kann im folgenden eine verzweigte oder unverzweigte primäre, sekundäre oder  
5 tertiäre aliphatische Gruppe wie Methyl, Ethyl, Propyl, Isopropyl, Butyl, Isobutyl, sec-Butyl, tert-Butyl, Pentyl, Isopentyl, sec-Pentyl, Hexyl, Heptyl, Octyl, Nonyl oder Decyl verwendet werden. Vorzugsweise bedeutet  $C_{1-10}$ -Alkyl, Ethyl, Propyl, Isopropyl oder Hexyl.

Als  $C_{1-10}$ -Alkenyl können beispielsweise Ethenyl, Propenyl, Allyl und Butenyl verwendet  
10 werden. Vorzugsweise wird Allyl verwendet.

Aryl bedeutet bevorzugt substituiertes oder unsubstituiertes Benzyl, Phenyl oder Naphtyl. Als  
substituiertes Benzyl kann beispielsweise halogeniertes Benzyl wie Chlor- oder Brombenzyl  
verwendet werden. Vorzugsweise wird unsubstituiertes Benzyl eingesetzt.

15  $C_{3-8}$ -Cycloalkyl bedeutet bevorzugt Cyclopropyl, Cyclobutyl, Cyclopentyl, Cyclohexyl, Cycloheptyl oder Cyclooctyl, vorzugsweise Cyclohexyl.

Alkoxyalkyl bedeutet bevorzugt  $C_{1-6}$ -Alkoxyethyl wie Methoxyethyl und Ethoxyethyl,  
20 besonders bevorzugt Ethoxyethyl.

Alkoxyalkoxyalkyl bedeutet bevorzugt 2-(2- $C_{1-6}$ -Alkoxy-ethoxy)-ethyl wie 2-(2-Methoxy-  
ethoxy)-ethyl und 2-(2-Ethoxy-ethoxy)ethyl, wobei letzteres besonders bevorzugt eingesetzt  
wird.

25 Bevorzugte Edukte sind demnach Trifluoracetessigsäureethyl-, Trifluoracetessigsäurepropyl-, Trifluoracetessigsäureisopropyl- und Trifluoracetessigsäurehexylester, Trifluoracetessigsäurecyclohexylester, Trifluoracetessigsäurebenzylester, Trifluoracetessigsäureethoxyethylester, und Trifluoracetessigsäureethoxyethoxyethylester.

30 Zweckmäßige Mikroorganismen, die befähigt sind, eine Carbonylfunktion zu reduzieren, sind beispielsweise Mikroorganismen, die ein exprimierbares Gen für ein Enzym enthalten, das

befähigt ist eine Carbonylfunktion zu reduzieren, beispielsweise ein Enzym mit Reduktase-Aktivität, insbesondere ein Gen für eine Aldehydreduktase, eine Alkoholdehydrogenase oder eine Ketonreduktase. Die Enzyme, die befähigt sind, eine Carbonylfunktion zu reduzieren, können NADPH ( $\beta$ -Nikotinsäureamid-adenin dinucleotidphosphat)-abhängig oder von anderen  
5 Cofaktoren abhängig sein. Vorzugsweise kommen Mikroorganismen mit NADPH-abhängigen Reduktionssystemen zum Einsatz.

Zellfreie Enzymextrakte dieser Mikroorganismen können durch fachmännisch übliche Methoden, beispielsweise durch French-Press-, Ultraschall- oder Lysozym-Methode, erhalten  
10 werden.

Zweckmässig wird die Biotransformation mittels Mikroorganismen durchgeführt, die eine Aldehydreduktase, insbesondere eine NADPH-abhängige Aldehydreduktase, enthalten.

15 Mikroorganismen, die eine NADPH-abhängige Aldehydreduktase enthalten, wie Mikroorganismen der Spezies *Sporobolomyces salmonicolor*, sind bereits von Shimizu et al., 1990, Applied and Environmental Microbiology, 56(8), 2374 - 2377 und Kataoka, M. et al., Biochimica et Biophysica Acta, 1122, 57-62 (1992), beschrieben. Diese Mikroorganismen können zum einen selbst für das erfindungsgemässe Verfahren eingesetzt werden, zum anderen  
20 als Ausgangsmaterial für die Konstruktion von Plasmiden und weiteren geeigneten Mikroorganismen dienen.

Zweckmässig werden für die Biotransformation rekombinante Mikroorganismen eingesetzt, die mit einem Gen codierend für ein Enzym, das befähigt ist eine Carbonylfunktion zu reduzieren,  
25 transformiert sind. Mikroorganismen, die mit einem solchen Gen transformiert sein können, sind beispielsweise Mikroorganismen der Gattung *Escherichia*, insbesondere der Spezies *Escherichia coli*, beispielsweise *Escherichia coli* JM109, *Escherichia coli* DH5 und *Escherichia coli* HB101.

30 Bevorzugt befindet sich das Gen mit der Reduktase-Aktivität, beispielsweise eine Aldehydreduktase, auf einem zur Transformation geeigneten Vektor, beispielsweise einem Plasmid.

zweckmäßig zusammen mit einem zur Expression des Gens geeigneten Promotor wie dem tac-Promotor ( $P_{lac}$ ).

5 Sofern die verwendeten Mikroorganismen NADPH-abhängige Enzyme enthalten, wird die Biotransformation zweckmäßig in Gegenwart von NADPH durchgeführt. Das NADPH wird entweder direkt in den erforderlichen Mengen zugesetzt oder in situ hergestellt. Vorteilhaft wird das NADPH in situ hergestellt. Zu diesem Zweck wird die Biotransformation zweckmäßig in Gegenwart eines NADPH-Generators oder Regenerators durchgeführt, d.h. eines Enzyms, das die Bildung von NADPH aus dessen oxidierten Form,  $NADP^+$ , katalysiert.

10 Zweckmäßig wird als NADPH-Generator oder -Regenerator eine Glucosedehydrogenase eingesetzt, beispielsweise Glucosedehydrogenase aus *Bacillus megaterium*.

Zur Generation von NADPH bei der Biotransformation wird diese zweckmäßig in Gegenwart eines Mikroorganismus durchgeführt, der den NADPH-Generator exprimiert. Insbesondere

15 werden hierzu rekombinante Mikroorganismen verwendet, die mit dem für den NADPH-Generator codierenden Gen transformiert sind. Das Gen für den NADPH-Generator befindet sich hierbei bevorzugt auf einem zur Transformation geeigneten Vektor, beispielsweise einem Plasmid, zweckmäßig zusammen mit einem zur Expression des Gens geeigneten Promotor wie dem tac-Promotor ( $P_{lac}$ ).

20 Für die Herstellung der Trifluor-3(R)-hydroxybuttersäurederivate der allgemeinen Formel I mit einem ein zur Reduktion einer Carbonylfunktion befähigtes, NADPH-abhängiges Enzym, beispielsweise eine NADPH-abhängige Aldehyd-Reduktase, enthaltenden Mikroorganismus in Gegenwart eines NADPH-Generators können verschiedene Mikroorganismen eingesetzt

25 werden, von denen einer zur Reduktion der Carbonylfunktion und einer zur Bildung von NADPH befähigt ist. Vorteilhaft enthalten die erfindungsgemäß verwendeten, zur Reduktion einer Carbonylfunktion befähigten Mikroorganismen aber bereits selbst ein für einen NADPH-Generator oder -Regenerator codierendes Gen, beispielsweise ein Gen codierend für eine Glucosedehydrogenase.

30 Vorteilhaft werden für die Biotransformation rekombinante Mikroorganismen eingesetzt, die mit einem für ein NADPH-abhängiges Enzym, beispielsweise einem für eine NADPH-

abhängige Aldehydreduktase codierenden Gen. und einem für einen NADPH-Generator oder -Regenerator, beispielsweise einem für eine Glucosedehydrogenase codierenden Gen, transformiert sind. In einer möglichen Ausführungsform befinden sich diese Gene zur Expression auf einem einzigen Plasmid. In einer weiteren Ausführungsform liegen diese Gene auf verschiedenen, miteinander kompatiblen Plasmiden vor.

Die Biotransformation kann also vorteilhaft mittels Mikroorganismen durchgeführt werden, die enthalten:

- mindestens einen Vektor, beispielsweise ein Plasmid, der ein Gen für ein zur Reduktion einer Carbonylfunktion befähigtes Enzym, beispielsweise ein Aldehydreduktase-Gen, enthält;
- mindestens zwei Vektoren, beispielsweise Plasmide, von denen der eine ein Gen für ein zur Reduktion einer Carbonylfunktion befähigtes Enzym, beispielsweise ein Aldehydreduktase-Gen, und der andere ein Gen für einen NADPH-Generator oder -Regenerator, beispielsweise ein Glucosedehydrogenase-Gen, enthält, oder
- mindestens einen Vektor, beispielsweise ein Plasmid, der sowohl ein Gen für ein zur Reduktion einer Carbonylfunktion befähigtes Enzym, beispielsweise ein Aldehydreduktase-Gen, als auch ein Gen für einen NADPH-Generator oder -Regenerator, beispielsweise ein Glucosedehydrogenase-Gen, enthält.

Vorzugsweise wird die Biotransformation mittels Mikroorganismen der Spezies *E. coli* JM109 oder *E. coli* DH5, transformiert mit mindestens zwei Plasmiden enthaltend jeweils ein Aldehydreduktase- oder ein Glucosedehydrogenase-Gen, oder mittels Mikroorganismen der Spezies *E. coli* HB101 oder *E. coli* DH5, transformiert mit mindestens einem Plasmid, welches beide Gene, das Aldehydreduktase- und das Glucosedehydrogenase-Gen enthält, durchgeführt. Insbesondere wird die Biotransformation mit *E. coli* JM109 und *E. coli* DH5, enthaltend ein Aldehydreduktase- und ein Glucosedehydrogenase-Gen, durchgeführt. Selbstverständlich kann die Biotransformation auch mit verschiedenen Mikroorganismen, die jeweils nur eines der genannten Gene enthalten, durchgeführt werden.

30

Fig. 1 zeigt die Struktur eines für die vorliegende Erfindung geeigneten Plasmids, pKAR, das das Gen für die NADPH-abhängige Aldehyd-Reduktase aus *Sporobolomyces salmonicolor*

zusammen mit dem Promotor  $P_{lac}$  und einer Ampicillin (Ap)-Resistenz als Selektionsmarker enthält.

Fig. 2 zeigt die Struktur eines weiteren für die vorliegende Erfindung geeigneten Plasmids, pKKGDH, das das Gen für die Glucosedehydrogenase aus *Bacillus megaterium* zusammen mit dem Promotor  $P_{lac}$  und einer Kanamycin (Km)-Resistenz als Selektionsmarker enthält.

Der Mikroorganismus *E. coli* JM109, enthaltend das Plasmid pKAR mit einem Gen codierend für die NADPH-abhängige Aldehydreduktase aus *Sporobolomyces salmonicolor* und das Plasmid pKKGDH mit einem Gen codierend für die Glucosedehydrogenase aus *Bacillus megaterium*, wurde am 16.12.1997 bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), D-38124 Braunschweig, Mascheroderweg 1b, unter der Bezeichnung DSM 11902 gemäss Budapester Vertrag hinterlegt. Der Mikroorganismen *E. coli* DH5, enthaltend die Plasmide pKAR und pKKGDH, wurde am 7.12.1998 bei der zuvor beschriebenen Hinterlegungsstelle unter der Bezeichnung DSM 12566 gemäss Budapester Vertrag hinterlegt.

Die Expression der Gene kann abhängig vom Expressionssystem erfolgen. Bei den erfindungsgemäß bevorzugt verwendeten Expressionssystemen kann die Expression der Gene beispielsweise durch IPTG (Isopropylthiogalactosid) induziert werden, wenn als Mikroorganismus *E. coli* JM109 oder *E. coli* HB101 verwendet werden. Bei der Verwendung von *E. coli* DH5 ist die Induktion mit IPTG, wie fachmännisch bekannt, nicht notwendig.

Die Biotransformation kann nach üblichem Anzüchten der Zellen in einem einphasigen oder zweiphasigen System, vorzugsweise in einem zweiphasigen System, durchgeführt werden.

Als einphasiges System können fachmännisch übliche Puffer-Medien wie beispielsweise niedermolare Phosphatpuffer oder Tris-Puffer angewendet werden.

Als zweiphasiges System können die genannten fachmännisch üblichen Puffer-Medien zusammen mit einem für das Edukt löslichen organischen Lösungsmittel verwendet werden. Als organische Lösungsmittel sind beispielsweise Ester, Alkohole, halogenierte Kohlenwas-

serstoffe. Ether, aliphatische C<sub>5-12</sub>-Kohlenwasserstoffe oder aromatische Kohlenwasserstoffe geeignet. Als Ester können Essigsäureester wie Essigsäuremethyl-, Essigsäureethyl-, Essigsäurepropyl- und Essigsäurebutylester verwendet werden. Als Alkohole können C<sub>4-10</sub>-Alkohole wie Hexanol, Heptanol und Octanol verwendet werden. Als aromatische Kohlenwasserstoffe können beispielsweise Benzol, Toluol und Xylol verwendet werden. Als halogenierte Kohlenwasserstoffe können beispielsweise Chloroform und Dichlormethan verwendet werden. Als Ether können beispielsweise Diethylether, Tetrahydrofuran, Methyl-tert-butylether und Dibutylether verwendet werden. Als aliphatische C<sub>5-12</sub>-Kohlenwasserstoffe sind beispielsweise Pentan, Hexan, Heptan, Octan, Nonan und Decan geeignet.

10

Geeignet ist ebenfalls ein zweiphasiges System in welchem die zweite Phase aus dem Edukt und / oder aus dem Produkt besteht. Um die Löslichkeit des Eduktes zu erhöhen, können Cosolvenzien eingesetzt werden. Als Cosolvenzien können entweder niedermolekulare aliphatische Alkohole wie beispielsweise Methanol, Ethanol, Propanol, Isopropanol, tert-Butanol oder inerte Lösungsmittel wie beispielsweise Dimethylsulfoxid, Aceton, Acetonitril verwendet werden.

15

Üblicherweise wird die Biotransformation in Gegenwart einer C-Quelle durchgeführt. Als C-Quelle sind beispielsweise Kohlenhydrate wie Glucose, Fructose oder Saccharose und Zuckeralkohole wie Glycerin geeignet.

20

Der pH-Wert der Medien kann in einem Bereich von 5 bis 10, vorzugsweise von 6 bis 8, liegen.

25

Zweckmässig wird die Biotransformation bei einer Temperatur von 5 bis 60 °C, vorzugsweise von 10 bis 40 °C, durchgeführt.

Nach einer Umsetzungszeit von wenigen Minuten bis 50 h, kann dann das gewünschte Produkt in hoher Ausbeute und Enantiomerenreinheit (ee) isoliert werden.

30

**Beispiele****Beispiel 1****5 Anzucht der Mikroorganismen**

Zellen von *E. coli* JM109/pKAR.pKKGDH (DSMZ 11902) wurden in einem 20 l Fermenter in 12 l Mineralsalzmedium (Tabelle 1) bei 22 °C angezüchtet. Nach 6 h wurde IPTG hinzugegeben, um die Zellen zu induzieren. Dann wurde Glycerin hinzugegeben und die Zellen bis zu einer optischen Dichte  $OD_{650nm} = 41,8$  innerhalb 52 h angezüchtet. Dann wurden die

10 Zellen bei -80 °C aufbewahrt.



Tabelle 1

|  |          |
|--|----------|
| Hefeextrakt  | 0,5 g/l  |
| Glycerin   | 30 g/l   |
| MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O               | 0,8 g/l  |
| CaCl <sub>2</sub>                                    | 0,16 g/l |
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>      | 2,0 g/l  |
| SLF-Lösung   | 1,0 ml/l |
| Fe-EDTA-Lösung                                       | 1,5 ml/l |
| PPG-2000   | 0,1 g/l  |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O | 1,0 g/l  |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                      | 1,0 g/l  |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>                      | 1,0 g/l  |
| Thiamin  | 10 mg/l  |

**SLF-Lösung:**

|  |          |
|--|----------|
| KOH  | 15,1 g/l |
| EDTA Na <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O            | 100 g/l  |
| ZnSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O               | 9,0 g/l  |
| MnCl <sub>4</sub> x 4H <sub>2</sub> O                | 4,0 g/l  |
| H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>                       | 2,7 g/l  |
| CoCl <sub>3</sub> x 6H <sub>2</sub> O                | 1,8 g/l  |
| CuCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O                | 1,5 g/l  |
| NiCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O                | 0,18 g/l |
| Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O | 0,27 g/l |

**Fe-EDTA-Lösung:**

|   |        |
|---|--------|
| KOH                                     | 10 g/L |
| EDTANa <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O | 50 g/L |
| FeSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O   | 20 g/l |

**Beispiel 2****Herstellung von 4,4,4-Trifluor-3(R)-hydroxybuttersäureethylester**

- 5 a) Zu 800 ml Mineralsalzmedium (Tabelle 1) enthaltend *E. coli* JM109/ pKAR,pKKGDH bei einer  $OD_{650nm}$  von 7,2 wurden 140 g Glucose und 0,56 g  $NADP^+$  hinzugegeben. 400 ml Butylacetat enthaltend 70 g 4,4,4-Trifluoracetoacetatethylester wurde hinzugefügt und die resultierende Mischung in einen 2 l Fermenter gegeben, bei 400 Upm gerührt und mit Luft (400 ml/min.) begast. Der pH wurde durch Zugabe von 1 M  $Na_2CO_3$  auf 6,0 gehalten.
- 10 Nach 24 h enthielt die organische Phase 48 g 4,4,4-Trifluor-3(R)-hydroxybuttersäureethylester mit einem ee-Wert von >99%, entsprechend einer molaren Ausbeute von 67,8 %.
- 15 b) Zu 800 ml Kaliumphosphatpuffer (100 mM, pH 6,0) enthaltend die Mikroorganismen gemäss Beispiel 1 bei einer  $OD_{650nm}$  von 30,7 wurden 140 g Glucose und 0,56 g  $NADP^+$  hinzugefügt. 400 ml Butylacetat enthaltend 70 g 4,4,4-Trifluoracetoacetatethylester wurden hinzugegeben und die resultierende Mischung in einen Fermenter entsprechend Beispiel 2a eingespeist. Der pH wurde durch Zugabe von 1 M  $Na_2CO_3$  auf pH 6,0 gehalten. Nach 25 h wurden nochmals 10 g 4,4,4-Trifluoracetoacetatethylester hinzugefügt. Nach 45
- 20 h enthielt die organische Phase 49 g 4,4,4-Trifluor-3(R)-hydroxybuttersäureethylester mit einem ee-Wert von > 99 %, entsprechend einer molaren Ausbeute von 60,6 %.
- 25 c) Zu 800 ml Kaliumphosphatpuffer (0,1 M, pH 6,0) enthaltend *E. coli* JM109/ pKAR,pKKGDH bei einer  $OD_{650}$  von 7,6 wurden 140 g Glucose und 50 mg  $NADP^+$  zugegeben. 400 ml Butylacetat enthaltend 70 g 4,4,4-Trifluoracetoacetatethylester wurden hinzugefügt und die resultierende Mischung in einen 2-l-Fermenter gegeben, mit 400 Upm gerührt und mit Luft (400 ml/min) begast. Der pH wurde durch Zugabe von 1M  $Na_2CO_3$  auf 6,0 gehalten. Weitere 50 mg  $NADP^+$  wurden 5 h nach Start des Fermenters zugegeben. Nach 24 h enthielt die organische Phase 50 g 4,4,4-Trifluor-3(R)-
- 30 hydroxybuttersäureethylester mit einem ee-Wert von >99,8%, entsprechend einer molaren Ausbeute von 71%.

- d) Zu 800 ml Kaliumphosphatpuffer (0,1 M, pH 6,0) enthaltend E. coli DH5/pKAR, pKKGDH bei einer  $OD_{630}$  von 6,5 wurden 140 g Glucose und 50mg  $NADP^+$  zugegeben. 400 ml Butylacetat enthaltend 70 g 4,4,4-Trifluoracetoacetatethylester wurden hinzugefügt und die resultierende Mischung in einen 2-l-Fermenter gegeben, mit 400 Upm gerührt und mit Luft (400 ml/min) begast. Der pH wurde durch Zugabe von 1M  $Na_2CO_3$  auf 6,0 gehalten. Weitere 50 mg  $NADP^+$  wurden jeweils nach 5 h und 26 h zugegeben. Nach 46 h enthielt die organische Phase 35 g 4,4,4-Trifluor-3(R)-hydroxybuttersäureethylester mit einem ee-Wert von 99,7%, entsprechend einer molaren Ausbeute von 51%.

### Beispiel 3

#### Herstellung von 4,4,4-Trifluor-3(R)-hydroxybuttersäureisopropylester

- a) Zu 800 ml Mineralsalzmedium entsprechend Beispiel 1 enthaltend E. coli JM109/pKAR, pKKGDH bei einer  $OD_{630nm}$  von 9,7 wurden 140 g Glucose und 0,56 g  $NADP^+$  hinzugefügt. 400 ml Butylacetat enthaltend 70 g 4,4,4-Trifluoressigsäureisopropylester wurden hinzugegeben und die resultierende Mischung in einem Fermenter entsprechend Beispiel 2 eingespeist. Der pH wurde durch Zugabe von 1 M  $Na_2CO_3$  auf pH 6,0 gehalten. Nach 21 h enthielt die organische Phase 42,2 g (R)-4,4,4-Trifluor-3-hydroxybuttersäureisopropylester mit einem ee-Wert von >99 %, entsprechend einer molaren Ausbeute von 59,7%.
- b) Zu 800 ml Kaliumphosphatpuffer (0,1 M, pH 6,0) enthaltend E. coli DH5/pKAR, pKKGDH bei einer  $OD_{630}$  von 8,5 wurden 140 g Glucose und 50mg  $NADP^+$  zugegeben. 400 ml Butylacetat enthaltend 70 g 4,4,4-Trifluoracetoacetatisopropylester wurden hinzugefügt und die resultierende Mischung in einen 2-l-Fermenter gegeben, mit 400 Upm gerührt und mit Luft (400 ml/min) begast. Der pH wurde durch Zugabe von 1M  $Na_2CO_3$  auf 6,0 gehalten. Weitere 50 mg  $NADP^+$  wurden 5 h nach Start des Fermenters zugegeben. Nach 24 h enthielt die organische Phase 32 g 4,4,4-Trifluor-3(R)-

hydroxybuttersäureisopropylester mit einem ee-Wert von >99,9%, entsprechend einer molaren Ausbeute von 46%.

#### 5 Beispiel 4

##### Herstellung von 4,4,4,-Trifluor-3(R)-hydroxybuttersäurehexylester

Zu 800 ml Kaliumphosphatpuffer (0,1 M, pH 6,0) enthaltend E. coli DH5/ pKAR,pKKGDH  
10 bei einer  $OD_{650}$  von 9,5 wurden 140 g Glucose und 50 mg  $NADP^+$  gegeben. 400 ml  
Butylacetat enthaltend 70 g 4,4,4-Trifluoracetoacetathexylester wurden hinzugefügt und die  
resultierende Mischung in einen 2-l-Fermenter gegeben. mit 400 Upm gerührt und mit Luft  
(400 ml/min) begast. Der pH wurde durch Zugabe von 1M  $Na_2CO_3$  auf 6,0 gehalten. Weitere  
50 mg  $NADP^+$  wurden 5 h nach Start des Fermenters zugegeben. Nach 24 h enthielt die  
15 organische Phase 2 g 4,4,4-Trifluor-3(R)-hydroxybuttersäurehexylester mit einem ee-Wert von  
>99,9%, entsprechend einer molaren Ausbeute von 3%.

#### 20 Beispiel 5

##### Herstellung von 4,4,4,-Trifluor-3(R)-hydroxybuttersäurecyclohexylester

Zu 800 ml Kaliumphosphatpuffer (0,1 M, pH 6,0) enthaltend E. coli DH5/pKAR,pKKGDH bei  
einer  $OD_{650}$  von 8,9 wurden 140 g Glucose und 50 mg  $NADP^+$  zugegeben. 400 ml Butylacetat  
25 enthaltend 70 g 4,4,4-Trifluoracetoacetatcyclohexylester wurden hinzugefügt und die  
resultierende Mischung in einen 2-l-Fermenter gegeben, mit 400 Upm gerührt und mit Luft  
(400 ml/min) begast. Der pH wurde durch Zugabe von 1M  $Na_2CO_3$  auf 6,0 gehalten. Weitere  
50 mg  $NADP^+$  wurden 5 h nach Start des Fermenters zugegeben. Nach 24 h enthielt die  
organische Phase 16 g 4,4,4-Trifluor-3(R)-hydroxybuttersäurecyclohexylester mit einem ee-  
30 Wert von >99,9%, entsprechend einer molaren Ausbeute von 23%.

**Beispiel 6****Herstellung von 4,4,4,-Trifluor-3(R)-hydroxybuttersäurebenzylester**

- 5 Zu 800 ml Kaliumphosphatpuffer (0,1 M, pH 6,0) enthaltend *E. coli* DH5/pKAR,pKKGDH bei einer  $OD_{650}$  von 9,0 wurden 140 g Glucose und 50 mg  $NADP^+$  zugegeben. 400 ml Butylacetat enthaltend 70 g 4,4,4-Trifluoracetoacetatbenzylester wurden hinzugefügt und die resultierende Mischung in einen 2-l-Fermenter gegeben, mit 400 Upm gerührt und mit Luft (400 ml/min) begast. Der pH wurde durch Zugabe von 1M  $Na_2CO_3$  auf 6,0 gehalten. Weitere 50 mg  $NADP^+$
- 10 wurden 5 h nach Start des Fermenters zugegeben. Nach 24 h enthielt die organische Phase 6 g 4,4,4-Trifluor-3(R)-hydroxybuttersäurebenzylester mit einem ee-Wert von >99,9%, entsprechend einer molaren Ausbeute von 9%.

**15 Beispiel 7****Herstellung von 4,4,4,-Trifluor-3(R)-hydroxybuttersäure-2-ethoxyethylester**

- Zu 600 ml Kaliumphosphatpuffer (0,1 M, pH 6,0) enthaltend *E. coli* DH5/pKAR,pKKGDH bei
- 20 einer  $OD_{650}$  von 10,2 wurden 105 g Glucose und 37,5mg  $NADP^+$  zugegeben. 300 ml Butylacetat enthaltend 35 g 4,4,4-Trifluoracetoacetatethoxyethylester wurden hinzugefügt und die resultierende Mischung in einen 2-l-Fermenter gegeben, mit 400 Upm gerührt und mit Luft (300 ml/min) begast. Der pH wurde durch Zugabe von 1M  $Na_2CO_3$  auf 6,0 gehalten. Weitere 37,5 mg  $NADP^+$  wurden 5 h nach Start des Fermenters zugegeben. Nach 24 h enthielt die
- 25 organische Phase 4 g 4,4,4-Trifluor-3(R)-hydroxybuttersäureethoxyethylester mit einem ee-Wert von 98,6%, entsprechend einer molaren Ausbeute von 12%.

**Beispiel 8****Herstellung von 4,4,4-Trifluor-3(R)-hydroxybuttersäure-2-(2-ethoxyethoxy)ethylester**

- 5 Zu 600 ml Kaliumphosphatpuffer (0.1 M, pH 6,0) enthaltend E. coli DH5/pKAR,pKKGDH bei einer  $OD_{650}$  von 10,7 wurden 105 g Glucose und 37,5 mg  $NADP^+$  zugegeben. 300 ml Butylacetat enthaltend 35 g 4,4,4-Trifluoracetoacetatethoxyethoxyethylester wurden hinzugefügt und die resultierende Mischung in einen 2-l-Fermenter gegeben, mit 400 Upm gerührt und mit Luft (300 ml/min) begast. Der pH wurde durch Zugabe von 1M  $Na_2CO_3$  auf
- 10 6,0 gehalten. Weitere 37,5 mg  $NADP^+$  wurden 5 h nach Start des Fermenters zugegeben. Nach 24 h enthielt die organische Phase 5 g 4,4,4-Trifluor-3(R)-hydroxybuttersäureethoxyethoxyethylester mit einem ee-Wert von >99,9%, entsprechend einer molaren Ausbeute von 16%.

15

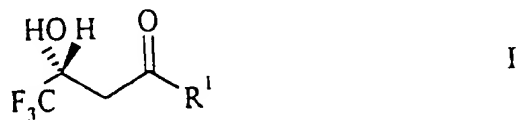
**Beispiel 9****Herstellung von 4,4,4-Trifluor-3(R)-hydroxybuttersäuremethylester**

- 20 Zu 600 ml Kaliumphosphatpuffer (0,1 M, pH 6,0) enthaltend E. coli DH5/pKAR,pKKGDH bei einer  $OD_{650}$  von 11,4 wurden 105 g Glucose und 37,5mg  $NADP^+$  zugegeben. 300 ml Butylacetat enthaltend 33 g 4,4,4-Trifluoracetoacetatmethylester wurden hinzugefügt und die resultierende Mischung in einen 2-l-Fermenter gegeben, mit 400 Upm gerührt und mit Luft (300 ml/min) begast. Der pH wurde durch Zugabe von 1M  $Na_2CO_3$  auf 6,0 gehalten. Weitere
- 25 37,5 mg  $NADP^+$  wurden 5 h nach Start des Fermenters zugegeben. Nach 24 h enthielt die organische Phase 3,6 g 4,4,4-Trifluor-3(R)-hydroxybuttersäuremethylester mit einem ee-Wert von 96,1%, entsprechend einer molaren Ausbeute von 7%.

## Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von Trifluor-3(R)-hydroxybuttersäurederivaten der allgemeinen Formel

5

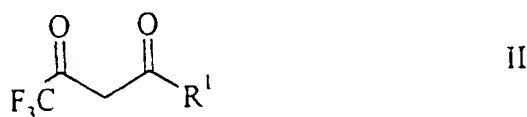


worin

- 10  $R^1$   $-OR^2$ , worin  $R^2$  Wasserstoff,  $C_{1-10}$ -Alkyl,  $C_{1-10}$ -Alkenyl,  $C_{3-8}$ -Cycloalkyl, Aryl, Alkoxyalkyl oder Alkoxyalkoxyalkyl ist,  
 $-NR^3R^4$ , worin  $R^3$  und  $R^4$  gleich oder verschieden sind und für Wasserstoff,  $C_{1-10}$ -Alkyl,  $C_{1-10}$ -Alkenyl,  $C_{3-8}$ -Cycloalkyl oder Aryl stehen, oder  
 $-SR^5$ , worin  $R^5$  Wasserstoff,  $C_{1-10}$ -Alkyl,  $C_{1-10}$ -Alkenyl, Aryl oder  $C_{3-8}$ -Cycloalkyl ist, bedeutet,

15

umfassend die Umsetzung eines Trifluoracetessigsäurederivats der allgemeinen Formel



20

worin  $R^1$  die genannte Bedeutung hat, mittels Mikroorganismen, die befähigt sind eine Carbonylfunktion zu reduzieren oder mittels einem zellfreien Enzymextrakt dieser Mikroorganismen.

25

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Biotransformation mittels Mikroorganismen der Gattung Escherichia durchgeführt wird, die mit einem Gen transformiert sind, das für ein Enzym codiert, welches befähigt ist, eine Carbonylfunktion zu reduzieren.

3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Biotransformation mittels Mikroorganismen der Spezies *Escherichia coli* JM109, *Escherichia coli* HB 101 oder *Escherichia coli* DH5 durchgeführt wird, die mit einem Gen transformiert sind, das für ein Enzym codiert, welches befähigt ist, eine Carbonylfunktion zu reduzieren.
- 5
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Biotransformation mittels Mikroorganismen der Spezies *Escherichia coli* JM109, *Escherichia coli* HB101 oder *Escherichia coli* DH5 durchgeführt wird, die mit Genen transformiert sind, die sowohl für ein Enzym, welches befähigt ist, eine Carbonylfunktion zu reduzieren, als auch für eine Glucosedehydrogenase codieren.
- 10
5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Biotransformation mittels Mikroorganismen der Spezies *Escherichia coli* JM109 oder der Spezies *Escherichia coli* DH5 durchgeführt wird, die mit den Plasmiden pKAR und pKKGDH transformiert sind, wie hinterlegt unter der Hinterlegungsnummer DSM 11902 bzw. DSM 12566.
- 15
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass die Biotransformation bei einer Temperatur von 5 bis 60°C durchgeführt wird.
- 20
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass die Biotransformation bei einem pH von 5 bis 10 durchgeführt wird.



1/1

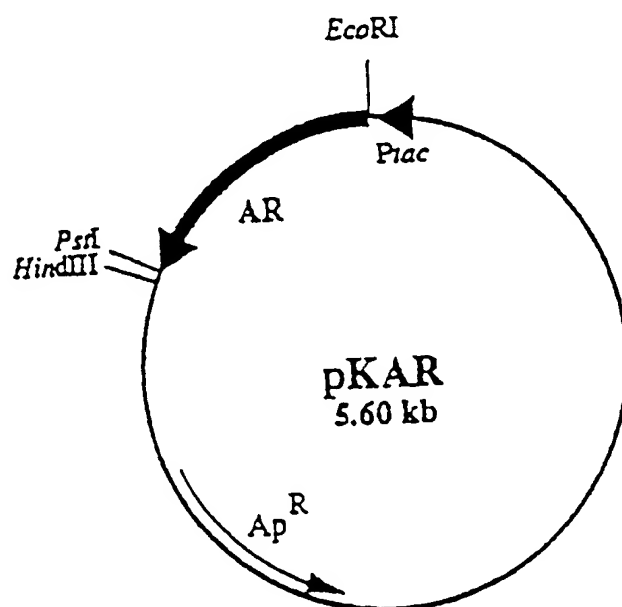


Fig. 1

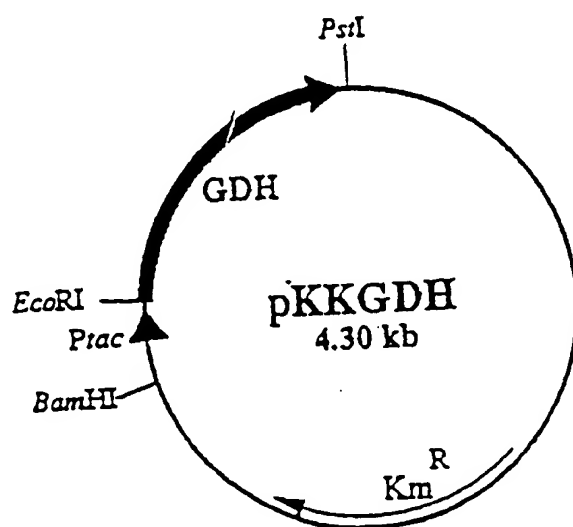


Fig. 2



## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N15/53 C12P7/42 C12P7/62 C12P11/00 C12P13/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12P C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages   | Relevant to claim No. |
|------------|--|-----------------------|
| X          | WO 93 18138 A (KERNFORSCHUNGSANLAGE JUELICH) 16 September 1993<br>see page 10 - page 16; claim 5; example 3; table 4   | 1,6,7                 |
| Y          | see claim 5; example 3; table 4  | 2,3                   |
| Y          | KITA: "cloning of the aldehyde reductase gene from a red yeast, <i>Sporobolomyces salmonicolor</i> , and characterization of the gene and its product"<br>APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, vol. 62, no. 7, July 1996, pages 2303-2310, XP002105940<br>see page 2308 - page 2309; figures 2,3.7<br>---<br>-/-- | 2,3                   |

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

16 June 1999

Date of mailing of the international search report

29/06/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

van Klompenburg, W

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages   | Relevant to claim No. |
|------------|--|-----------------------|
| X          | EHRLER ET AL: "Notiz über<br>microbiologische Umsetzungen mit<br>Halobacterium halobium: Reduktion von<br>3-Oxobutansäure-ethylester und Hydrolyse<br>von 3-Hydroxybutansäure-ethylester.<br>Cooperative Effekte von Reduktase und<br>Hydrolase"<br>HELVETICA CHIMICA ACTA,<br>vol. 72, 1989, pages 793--799, XP002008201<br>see page 796 - page 798; table 2<br>----- | 1,6                   |
| A          | EP 0 645 453 A (DAICEL CHEM) 29 March 1995<br>see page 7, line 31 - line 51; examples<br>16-19<br>-----  | 2-4                   |

| Patent document<br>cited in search report |   | Publication<br>date | Patent family<br>member(s) | Publication<br>date |
|---|---|---------------------|----------------------------|---------------------|
| W0 9318138                                | A | 16-09-1993          | CA 2117482                 | 16-09-1993          |
|   |   |                     | A 59306681                 | 10-07-1997          |
|   |   |                     | D 630402                   | 22-12-1997          |
|   |   |                     | T 0630402                  | 28-12-1994          |
|   |   |                     | A 7505770                  | 29-06-1995          |
|   |   |                     | T 5523223                  | 04-06-1996          |
| <hr/>                                     |   |                     |                            |                     |
| EP 0645453                                | A | 29-03-1995          | JP 7231785                 | 05-09-1995          |
|   |   |                     | A 5763236                  | 09-06-1998          |
| <hr/>                                     |   |                     |                            |                     |



A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
IPK 6 C12N15/53 C12P7/42 C12P7/62 C12P11/00 C12P13/02

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

# B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)  
IPK 6 C12P C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

# C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile   | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|--|--------------------|
| X          | WO 93 18138 A (KERNFORSCHUNGSANLAGE JUELICH) 16. September 1993<br>siehe Seite 10 - Seite 16; Anspruch 5;<br>Beispiel 3; Tabelle 4   | 1,6,7              |
| Y          | siehe Anspruch 5; Beispiel 3; Tabelle 4  | 2,3                |
| Y          | KITA: "cloning of the aldehyde reductase gene from a red yeast, <i>Sporobolomyces salmonicolor</i> , and characterization of the gene and its product"<br>APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY,<br>Bd. 62, Nr. 7, Juli 1996, Seiten<br>2303-2310, XP002105940<br>siehe Seite 2308 - Seite 2309; Abbildungen<br>2,3,7 | 2,3                |

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen:

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

16. Juni 1999

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

29/06/1999

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Beauftragter

van Klompenburg, W

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile   | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|--|--------------------|
| X          | EHRLER ET AL: "Notiz über<br>microbiologische Umsetzungen mit<br>Halobacterium halobium: Reduktion von<br>3-Oxobutansäure-ethylester und Hydrolyse<br>von 3-Hydroxybutansäure-ethylester.<br>Cooperative Effekte von Reduktase und<br>Hydrolase"<br>HELVETICA CHIMICA ACTA,<br>Bd. 72, 1989, Seiten 793--799, XP002008201<br>siehe Seite 796 - Seite 798; Tabelle 2<br>--- | 1,6                |
| A          | EP 0 645 453 A (DAICEL CHEM) 29. März 1995<br>siehe Seite 7, Zeile 31 - Zeile 51;<br>Beispiele 16-19<br>-----  | 2-4                |



| Im Recherchenbericht<br>angeführtes Patentdokument | Datum der<br>Veröffentlichung | Mitglied(er) der<br>Patentfamilie | Datum der<br>Veröffentlichung |
|--|-------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|
| WO 9318138 A                                       | 16-09-1993                    | CA 2117482 A                      | 16-09-1993                    |
|  |                               | DE 59306681 D                     | 10-07-1997                    |
|  |                               | DK 630402 T                       | 22-12-1997                    |
|  |                               | EP 0630402 A                      | 28-12-1994                    |
|  |                               | JP 7505770 T                      | 29-06-1995                    |
|  |                               | US 5523223 A                      | 04-06-1996                    |
| EP 0645453 A                                       | 29-03-1995                    | JP 7231785 A                      | 05-09-1995                    |
|  |                               | US 5763236 A                      | 09-06-1998                    |

|   |    |  |
|---|----|--|
| (51) Internationale Patentklassifikation <sup>5</sup> :<br><br>C12N 9/02, C12P 7/00   | A1 | (11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 93/18138<br>(43) Internationales<br>Veröffentlichungsdatum: 16. September 1993 (16.09.93)  |
| (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE93/00198<br>(22) Internationales Anmeldedatum: 5. März 1993 (05.03.93)<br>(30) Prioritätsdaten:<br>P 42 07 921.7          13. März 1992 (13.03.92)          DE<br>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): FOR-<br>SCHUNGSZENTRUM JÜLICH GMBH [DE/DE];<br>Wilhelm-Johnen-Straße, D-5170 Jülich (DE).<br>(72) Erfinder; und<br>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US) : KULA, Maria-Regina<br>[DE/DE]; Selgenbusch 12, D-5162 Niederzier (DE). PE-<br>TERS, Jörg [DE/DE]; Albrecht-Dürer-Straße 45, D-4006<br>Erkrath 1 (DE).  |    | (74) Gemeinsamer Vertreter: FORSCHUNGSZENTRUM JÜ-<br>LICH GMBH; Rechts- und Patentabteilung, Postfach<br>1913, D-5170 Jülich (DE).<br>(81) Bestimmungsstaaten: CA, JP, KR, US, europäisches Patent<br>(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU,<br>MC, NL, PT, SE).<br>Veröffentlicht<br><i>Mit internationalem Recherchenbericht.<br/>         Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelasse-<br/>         nen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderun-<br/>         gen eintreffen.</i> |
| (54) Title: NEW KETONIC ESTER REDUCTASES, ITS PREPARATION AND USE FOR ENZYMATIC REDOX REAC-<br>TIONS<br>(54) Bezeichnung: NEUE KETOESTER-REDUKTASE, DEREN HERSTELLUNG UND VERWENDUNG FÜR ENZYMA-<br>TISCHE REDOXREAKTIONEN<br>(57) Abstract<br><p>An enzyme designated as ketonic ester reductase capable of being used in the NADH-dependent enzymatic reaction of <math>\beta</math>, <math>\gamma</math> and <math>\delta</math> ketonic acid esters into the corresponding optically active <math>\beta</math>, <math>\gamma</math> and <math>\delta</math> hydroxycarboxylic acid esters can be isolated from strains of <i>Candida parapsilosis</i>, <i>Yarrowinia cellobiosa</i>, <i>Rhodococcus erythropolis</i> or <i>Pseudomonas acidovorans</i>, preferably cultivated on a long-chain alkane and/or alkane acid-containing culture medium, appropriately in the presence of an inductor. An usable enzyme preparation can be recovered by fractionated PEG-precipitation from the cell raw extract; high specific activities (for example 1855 U/mg) may then be obtained by chromatographic purification. The enzyme is characterized by a wide substrate spectrum. Not only (possibly substituted) so-called ketonic esters are accepted, but also a number of other oxo-compounds, among which diketones, (possibly substituted, in particular halogenated) aliphatic, alicyclic and aromatic ketones, as well as ketoacetals and aldehydes. The S-enantiomer-forming reduction is supplemented by the possibility to recover R-enantiomers from racemates by oxidizing the S-enantiomer and separating the oxo-compound.</p> (57) Zusammenfassung<br><p>Aus Stämmen von <i>Candida parapsilosis</i>, <i>Yarrowinia cellobiosa</i>, <i>Rhodococcus erythropolis</i> oder <i>Pseudomonas acidovorans</i> ist ein als Ketoester-Reduktase bezeichnetes Enzym isolierbar, das zur NADH-abhängigen enzymatischen Umsetzung von <math>\beta</math>-, <math>\gamma</math>- und <math>\delta</math>-Ketocarbonsäureestern zu den entsprechenden optisch aktiven <math>\beta</math>-, <math>\gamma</math>- und <math>\delta</math>-Hydroxycarbonsäureestern befähigt ist. Die Kultivierung erfolgt vorzugsweise auf einem längerkettigen Alkanen und/oder Alkansäuren enthaltenden Nährmedium, zweckmäßigerweise in Gegenwart eines Induktors. Aus dem Zellrohextrakt kann ein brauchbares Enzympräparat durch fraktionierte PEG-Fällung gewonnen werden; durch anschließende chromatographische Aufreinigung können hohe spezifische Aktivitäten (z.B. 1855 U/mg) erzielt werden. Das Enzym zeichnet sich durch ein breites Substratspektrum aus: so werden nicht nur die genannten (ggf. substituierten) Ketoester akzeptiert, sondern eine Vielzahl weiterer Oxo-Verbindungen, zu denen Diketone, (ggf. substituierte, insb. halogenierte) aliphatische, alicyclische und aromatische Ketone sowie Ketoacetale und Aldehyde gehören. Die Reduktion unter Bildung von S-Enantiomeren wird durch die Möglichkeit zur Gewinnung von R-Enantiomeren aus Racematen durch Oxidation des S-Enantiomeren und Abtrennung der Oxo-Verbindung ergänzt.</p> |    |  |

# **LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

Code, die zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

|    |                                |    |                                   |    |                                |
|----|--------------------------------|----|-----------------------------------|----|--------------------------------|
| AT | Österreich                     | FR | Frankreich                        | MR | Mauritanien                    |
| AU | Australien                     | GA | Gabon                             | MW | Malawi                         |
| BB | Barbados                       | GB | Vereinigtes Königreich            | NL | Niederlande                    |
| BE | Belgien                        | GN | Guinea                            | NO | Norwegen                       |
| BF | Burkina Faso                   | GR | Griechenland                      | NZ | Neuseeland                     |
| BG | Bulgarien                      | HU | Ungarn                            | PL | Polen                          |
| BJ | Benin                          | IE | Irland                            | PT | Portugal                       |
| BR | Brasilien                      | IT | Italien                           | RO | Rumänien                       |
| CA | Kanada                         | JP | Japan                             | RU | Russische Föderation           |
| CF | Zentrale Afrikanische Republik | KP | Demokratische Volksrepublik Korea | SD | Sudan                          |
| CG | Kongo                          | KR | Republik Korea                    | SE | Schweden                       |
| CH | Schweiz                        | KZ | Kasachstan                        | SK | Slowakische Republik           |
| CI | Côte d'Ivoire                  | LI | Liechtenstein                     | SN | Senegal                        |
| CM | Kamerun                        | LK | Sri Lanka                         | SU | Sowjet Union                   |
| CS | Tschechoslowakei               | LU | Luxemburg                         | TD | Tschad                         |
| CZ | Tschechische Republik          | MC | Monaco                            | TC | Togo                           |
| DE | Deutschland                    | MG | Madagaskar                        | UA | Ukraine                        |
| DK | Dänemark                       | ML | Mali                              | US | Vereinigte Staaten von Amerika |
| ES | Spanien                        | MN | Mongolei                          | VN | Vietnam                        |
| FI | Finnland                       |    |                                   |    |                                |

## B e s c h r e i b u n g

### Neue Ketoester-Reduktase, deren Herstellung und Verwendung für enzymatische Redoxreaktionen

---

Gegenstand der Erfindung ist eine neue zur NADH-abhängigen enzymatischen Umsetzung von  $\beta$ -,  $\gamma$ - und  $\delta$ -Ketoestern zu den entsprechenden optisch aktiven  $\beta$ -,  $\gamma$ - und  $\delta$ -Hydroxysäureestern befähigte Ketoester-Reduktase, die aus Stämmen von *Candida parapsilosis*, *Yarrowinia cellobiosa*, *Rhodococcus erythropolis* oder *Pseudomonas acidovorans* isolierbar ist.

Optisch aktive  $\beta$ -,  $\gamma$ - und  $\delta$ -Hydroxycarbonsäureester sind wertvolle chirale Synthesebausteine, die eine breite Anwendung in der Synthese von Pharmaka, Aromastoffen, Pheromonen, Agrochemikalien und Enzym-Inhibitoren finden. Sie sind auf konventionellem chemischem Wege nur schwer zugänglich, da die Trennung des durch chemische Reduktion entstehenden Enantiomerengemisches aufwendig und kostenintensiv ist.

Bekannt sind Arbeiten zur fermentativen Herstellung von  $\beta$ -,  $\gamma$ - und  $\delta$ -Hydroxycarbonsäuren und -estern mit Hilfe von Mikroorganismen. Dabei werden die mikrobiellen Zellen stets im Überschuß eingesetzt und die Ausbeute und Enantiomerenüberschüsse variieren je nach Herkunft der Zellen über einen weiten Bereich. Am häufigsten wird dabei die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* eingesetzt.

Bekannt sind auch bereits aus *Saccharomyces cerevisiae* isolierte Oxidoreduktasen, welche die enzymatische Reduktion der  $\beta$ -,  $\gamma$ - und  $\delta$ -Ketogruppe von entsprechenden Ketoestern unter Bildung der entsprechenden optisch aktiven Hydroxyverbindungen katalysieren (Heidlas et al. (1988) Eur. J. Biochem. 172: 633-639). Diese bekannten Oxidoreduktasen benötigen NADPH als Cokatalysator, dessen Regenerierung diffizil ist, weshalb die gewerbliche Akzeptanz dieses an sich bekannten enzymatischen Syntheseweges nicht ohne weiteres gegeben ist.

Ziel der Erfindung war daher eine durch NADH cokatalysierte enzymatische Umsetzung von  $\beta$ -,  $\gamma$ - und  $\delta$ -Ketoestern sowie ein dafür geeignetes Enzym.

Dieses wurde überraschenderweise in bestimmten Hefen und Bakterien gefunden, und zwar in *Candida parapsilosis* und *Yarrowinia cellobiosa* sowie in *Rhodococcus erythropolis* und *Pseudomonas acidovorans*, die in der Lage sind *n*-Alkane bzw. *n*-Alkansäure zu verwerten. Die aus *Candida parapsilosis* und *Rhodococcus erythropolis* isolierte Ketoester-Reduktase wurde umfangreich untersucht.

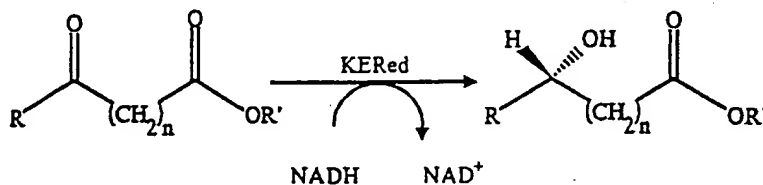
Besonders hohe Aktivitäten der neuen Ketoester-Reduktase (KERed) wurden erzielt, wenn *Candida parapsilosis* bzw. *Rhodococcus erythropolis* auf einem Nährmedium gezüchtet wurden, das längerkettige Alkansäuren bzw. Alkane, und zwar insbesondere Dodecansäure und Tetradecan, als Kohlenstoff-Quelle enthielt.

Besonders intensiv wurde die Bildung der KERed mittels *Candida parapsilosis* DSM 70.125 und die Isolierung und Aufreinigung des Enzyms aus diesem Stamm untersucht.

Die gereinigte KERed zeichnet sich durch folgende Parameter aus :

- ein pH-Optimum für die Ketoester-Reduktion zwischen pH 7,8 und 8,0 und für die Rückreaktion um pH 9,5.
- ein Temperatur-Optimum für die Ketoester-Reduktion zwischen 36°C und 40°C und für die Rückreaktion von 50°C bis 56°C.
- rasche Desaktivierung durch  $\text{Hg}^{2+}$ -,  $\text{Pb}^{2+}$ -,  $\text{Ag}^{+}$ -,  $\text{Cu}^{2+}$ -,  $\text{Ni}^{2+}$ -,  $\text{Sn}^{2+}$ - und  $\text{Co}^{2+}$ -Ionen. Starke Inhibierung durch p-Hydroxymercuribenzoat, 5,5'-Dithio-Bis(2-Nitrobenzoat) und Jodacetamid sowie durch die Chelatoren 2,2'-Bipyridyl und o-Phenanthrolin. Stabilisierung durch SH-Schutzreagenzien wie Dithiothreitol.
- zusätzliche Befähigung zur Reduktion von aliphatischen, alicyclischen und aromatischen Ketonen, Diketonen, Ketalen und Aldehyden sowie zur Oxidation von primären und sekundären Alkoholen

Die reduktive enzymatische Umsetzung von  $\beta$ -,  $\gamma$ - und  $\delta$ -Ketoestern zu den entsprechenden optisch aktiven Hydroxycarbonsäureestern erfolgt nach folgender Gleichung :



R und R' können Reste breiter Vielfalt sein wie aus Tabelle 4 hervorgeht. n kann Werte zwischen 1 und 3 annehmen. Darüberhinaus skizziert das Modell der Substratbindungsstelle (Fig. 5, Tabelle 5, Beispiel 3.G) die Grenzen der Substratakzeptanz.

Neben den Ketoestern werden von der KERed weitere Oxoverbindungen als Substrate akzeptiert, wie insbesondere 1,1-Dichloraceton, Chloraceton, 3-Chlor-2-Butanon, 2-Octanon, 2-Butanon, 2-Pentanon, 2-Methyl-3-Pentanon, Methoxy-2-Propanon, Acetophenon, 3-Chloracetophenon, 4-Fluoracetophenon, 4-Bromacetophenon, Propiophenon, 2,4-Hexandion, 2,4-Pentandion sowie Acetaldehyd, Isobutyraldehyd und Propionaldehyd. Acetophenon wird zu (*S*)-Phenylethanol, 3-Oxobuttersäureethylester zu (*S*)-3-Hydroxybuttersäureethylester und 5-Oxohexansäureethylester zu (*S*)-5-Hydroxyhexansäureethylester umgesetzt.

Interessant ist in diesem Zusammenhang speziell die Möglichkeit der Umsetzung von Acetophenon, 4-Bromacetophenon, 3-Chloracetophenon und 4-Fluoracetophenon zu den entsprechenden (*S*)-Phenylethanolen in NADH-Cokatalyse, da bislang nur die (*R*)-spezifische Umsetzung realisiert ist.

Die Rückreaktion (Oxidation der Hydroxygruppe) ist ebenso enzymatisch durchführbar und kann insbesondere dazu ausgenutzt werden, durch Umsetzung des *S*-Enantiomeren eines Racemats von *R*- und *S*-Hydroxyverbindungen das ggf. gewünschte *R*-Enantiomere zu gewinnen.

Die nachstehend im einzelnen beschriebene Ketoester-Reduktase ist, wie dargelegt, nicht nur zur Reduktion der  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -Ketogruppen der Ketoester befähigt, sondern darüberhinaus zur Reduktion einer breiten Vielfalt von Carbonylverbindungen verwendbar. Daher kann das Enzym auch als Carbonyl-Reduktase bezeichnet werden.

Das neue Enzym kann innerhalb der EC-Klassifizierung unter der Nummer [EC 1.2.1] eingeordnet werden. Eine genaue Zuweisung einer EC-Nummer steht bisher allerdings noch aus. Der Einfachheit halber wird das neue Enzym in der anschließenden Beschreibung als Ketoester-Reduktase (KERed) bezeichnet.

Man erhält die KERed in an sich bekannter Weise durch Kultivierung (in üblichen Nährmedien ggf. in Gegenwart von Alkanen und/oder Alkansäuren) der genannten Mikroorganismen, aus deren Rohextrakt ein verwendbares Enzympräparat durch fraktionierte PEG-Fällung erhalten werden kann, bei der zunächst mit relativ niedermolekularem Polyethylenglycol (PEG) für die Ausfällung von Begleitproteinen gesorgt wird, während die KERed noch in Lösung bleibt, die dann aus der Flüssigkeit durch PEG mit erhöhtem Molekulargewicht ausgefällt und aus dem Niederschlag durch Pufferlösung wieder "extrahiert" wird.

Alternativ kann mit unterschiedlichen PEG-Konzentrationen aber gleichbleibendem Molekulargewicht im Bereich von 1.000 bis 10.000, insbesondere um 5.000, gearbeitet werden. Eine weitere Reinigung durch chromatographische Trennmethode führt zu bevorzugten Isolaten mit höherer spezifischer Aktivität wie anhand des nachfolgend wiedergegebenen Beispiels dargelegt wird.

Im Folgenden wird die Erfindung mehr im einzelnen anhand von Beispielen beschrieben. Dabei wird auf die angefügten Zeichnungen Bezug genommen. Es zeigen :

Figur 1 und 2      die Bildung der KERed mittels *C. parapsilosis* bei Wachstum auf Glycerin (1) bzw. Dodecansäure (2)

Figur 3      die Regulation der Aktivität der KERed aus *C. parapsilosis*  
a) 5.4% Glucose, b) 0.8% Glucose, c) 2% Glycerin, d) 2% Glycerin + 0.1% Induktor, e) 1% Dodecansäure, f) 1% Dodecansäure + 0.1% Induktor; Induktor : 3-Oxohexansäureethylester

Figur 4      die pH-Abhängigkeit der KERed-Aktivität bei Oxidation und Reduktion

Figur 5      Modell der Substratbindungsstelle der KERed aus *C. parapsilosis*

Figur 6      die chromatographische Trennung von (R)- und (S)-3-Hydroxybuttersäuremethylester und zwar (a) für das racemische Gemisch und (b) für das erfindungsgemäße KERed-Umsetzungsprodukt

Figur 7      die chromatographische Trennung von (R)- und (S)-5-Hydroxybuttersäureethylester für das erfindungsgemäße KERed-Umsetzungsprodukt

## Beispiel 1 : Gewinnung des Enzyms

### 1. Screening

Sammlungsstämme der DSM (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig) wurden in dem von der DSM empfohlenen Medium angezogen, die Zellmasse durch Zentrifugation geerntet und durch Naßvermahlung aufgeschlossen. Der Überstand diente als Enzymquelle (Rohextrakt) und wurde auf Ketoester-Reduktase-Aktivität untersucht. Der Test wurde photometrisch durchgeführt, wobei der Testansatz folgende Komponenten enthielt :

- 0,2 mM NAD(P)H
- 8 mM Ketoester
- 0,1 M Triethanolamin (TEA)-NaOH-Puffer, pH 7
- limitierende Mengen an Rohextrakt

Es wurde die NAD(P)H-Abnahme bei 334 nm über einen Zeitraum von 1 Minute verfolgt. Zur Aktivitätsberechnung wurde ein Absorptionskoeffizient von  $6,18 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  verwendet. Tabelle 1 faßt die erhaltenen spezifischen Aktivitäten für die einzelnen Mikroorganismen zusammen, die sich aus einer Gruppe von 65 getesteten Mikroorganismen als tauglich erwiesen haben.

Pro Mikroorganismus ist in der ersten Zeile die NADH-abhängige, in der zweiten Zeile die NADPH-abhängige spezifische Aktivität in mU/mg angegeben. Ein U (Unit) entspricht einem Umsatz von  $1 \mu\text{mol}$  reduziertem Coenzym pro Minute.



Tabelle 1

| KERed aus :            | AEEE <sup>1)</sup> | BEEE | ABS                | ABEE | LS   | LSEE |
|------------------------|--------------------|------|--------------------|------|------|------|
| mU/mg                  |                    |      |                    |      |      |      |
| <i>P. acidovorans</i>  | 49.0               | 11.6 | 9.1                | 15.9 | 2)   | 4.1  |
| -                      | -                  | 15.6 | 3.5                | -    | -    | -    |
| <i>R. erythropolis</i> | 153.0              | 3.0  | n.b. <sup>3)</sup> | 97.0 | n.b. | 87.1 |
| -                      | -                  | -    | n.b.               | -    | n.b. | -    |
| <i>C. parapsilosis</i> | 91.0               | 49.0 | 16.4               | 96.1 | 2.7  | 85.1 |
|                        | 14.1               | 25.0 | 25.0               | 4.5  | 2.4  | 1.3  |
| <i>Y. cellobiosa</i>   | 103.1              | 20.3 | n.b.               | 55.4 | n.b. | 41.1 |
|                        | 5.0                | -    | n.b.               | -    | n.b. | 4.0  |

<sup>1)</sup>AEEE: Acetessigsäureethylester ; BEEE: Butyrylessigsäureethylester ; ABS: Acetylbuttersäure ; ABEE: Acetylbuttersäureethylester ; LS: Laevulinsäure ; LSEE: Laevulinsäureethylester ; <sup>2)</sup>-: Aktivität unter der Nachweisgrenze ; <sup>3)</sup>n.b.: nicht bestimmt

## 2. Züchtung von *Candida parapsilosis*

Zur Enzymgewinnung wurde *Candida parapsilosis* in folgendem Medium angezogen (pro 1 l) :

|                   |       |                    |
|-------------------|-------|--------------------|
| Hefeextrakt       | 10 g  |                    |
| Kaliumphosphat    | 1 g   |                    |
| Ammoniumsulfat    | 1.2 g |                    |
| Glycerin          | 20 g  | (nicht reprimiert) |
| oder Glucose      | 54 g  | (reprimiert)       |
| oder Glucose      | 8 g   | (dereprimiert)     |
| oder Dodecansäure | 10 g  |                    |

ggf. 0,1%iger Zusatz von 3-Oxohexansäureethylester (Induktor)

Der pH-Wert dieser Lösung wurde auf 4,5 eingestellt, dann wurde für 15 min bei 121°C (2 bar) sterilisiert. Der Organismus wurde aerob kultiviert. Im 10 l-Maßstab wurde das Medium nach Erreichen der Bruttemperatur von 30°C mit 400 ml einer 20 Std. alten Vorkultur beimpft. In einem solchen 10 l-Ansatz wurde beispielhaft der Verlauf der Enzymaktivität über der Zeit bestimmt, indem Proben zu verschiedenen Zeiten entnommen wurden und die Aktivität der Ketoester-Reduktase nach Aufschluß der Zellen bestimmt wurde. In Fig. 1 ist ein solcher Verlauf dargestellt, die Aktivität der Ketoester-Reduktase erreicht nach 20 Std. einen maximalen Wert und fällt anschließend wieder ab. Die Zellernte erfolgte nach 20 Stunden durch Zentrifugation, wobei aus 8 l Medium 175 g Feuchtmasse erhalten wurden. Die Zellmasse kann bei -20 °C eingefroren gelagert werden, wobei über mehrere Wochen kein Aktivitätsverlust erkennbar ist.

### 3. Enzymisolierung (Rohextrakt)

Die Enzymfreisetzung aus den ganzen Zellen kann durch an sich bekannte Methoden (Ultraschall, Hochdruck-Homogenisation, Naßvermahlung u.a.) geschehen. Hier wurden die Zellen durch Naßvermahlung mit Glasperlen aufgeschlossen. Dazu wurde die Zellmasse (175 g) in Aufschlußpuffer (200 mM TEA-NaOH-Puffer (pH 7,5) unter Zusatz von 5 mM Dithiothreitol und 1 mM Protease-Inhibitor (Pefabloc, Fa. Merck, Darmstadt) suspendiert, so daß die Konzentration der Zellfeuchtmasse 25%ig war (700 ml Endvolumen).

Die Zellinhaltsstoffe wurden aus der gekühlten Suspension (4°C) durch einen mechanischen Aufschluß mit Hilfe einer Glasperlenmühle (Desintegrator S, Fa. IMA, Frankfurt) freigesetzt. Der Mahlbehälter wurde dazu mit Glasperlen (0,5 mm : 0,3 mm = 2 : 1 - Verhältnis, 90 ml) gefüllt und mit 60 ml der 25%igen Zellsuspension aufgefüllt. Der Aufschluß wurde bei einer Rührwellendrehzahl von 4000 UpM durchgeführt. Der Kühlmantel wurde während des Laufs gekühlt. Eine Aufschlußzeit von 9 min erwies sich als optimal und wurde für den Zellaufschluß verwendet. Nach dem Zellaufschluß wurde der Überstand dekantiert und die Glasperlen zweimal mit Aufschlußpuffer gewaschen.

175 g Hefefeuchtmasse ergaben 285 ml Rohextrakt mit einer Volumenaktivität von 6,6 U/ml und einem Proteingehalt von 10,7 mg/ml. Hieraus läßt sich errechnen, daß aus 100 l Fermenteransatz ca. 23 000 Einheiten Ketoester-Reduktase gewonnen werden können (1 Enzymeinheit ist die Enzymmenge, die 1 µmol Acetylbuttersäureethylester pro Minute umsetzt).

#### 4. Anreicherung des Enzyms

Das Enzym kann durch an sich bekannte Methoden der Proteinreinigung wie zweistufige, fraktionierte Polyethylenglycol-Fällung, Ionenaustausch-Chromatographie und Affinitätschromatographie angereichert und gereinigt werden.

##### 4.1 Fraktionierte Polyethylenglycol-Fällung

Eisgekühlter Rohextrakt (4°C) wird unter Rühren und pH-Kontrolle (pH 7-7,5) mit Polyethylenglycol ( $M_w$ : 5000) bis zu einer Konzentration von 4% (w/v) versetzt. Nach Zentrifugieren bei 10 000 UpM für 10 min wird der Überstand weiter mit PEG<sub>5000</sub> bis zu einer Endkonzentration von 30% versetzt. Das nach Zentrifugation bei 10 000 UpM für 15 min erhaltene Sediment enthält die Ketoester-Reduktase-Aktivität und kann in Triethanolamin-NaOH-Puffer, 20 mM, pH 7,5 aufgenommen und lyophilisiert werden. Das Enzym ist unter diesen Bedingungen mehrere Monate ohne Aktivitätsverlust haltbar.

##### 4.2 Ionenaustausch-Chromatographie

1 ml resuspendiertes Sediment aus der 30%igen PEG-Fällung (entspr. Beisp. 1; 4.1) wird auf eine Q-Sepharose-FastFlow-Säule (Anionen-Austauscher, HiLoad, High Performance, 16/10, 20 ml Gelvolumen) aufgetragen (FPLC-Chromatographie-System der Fa. Pharmacia, Freiburg). Die Säule ist mit Puffer A äquilibriert worden (20 mM Triethanolamin-NaOH-Puffer; pH 7,5). Nach ausgiebigem Waschen der Säule mit Puffer A wird die Ketoester-Reduktase mit einem linearen NaCl-Gradienten (0-200 mM) eluiert, wobei das Enzym bei ca. 100 mM NaCl eluiert. Die Chromatographie wurde bei einer Flußrate von 1 ml/min durchgeführt. Die erzielte Anreicherung ist in Tab. 2 zusammengefaßt.

##### 4.3 Affinitätschromatographie

Die Fraktionen der Q-Sepharose-Chromatographie mit der höchsten Aktivität werden gesammelt, mit Hilfe einer Ultrafiltrationszelle (Amicon, Witten/Ruhr) aufkonzentriert und weiter aufgereinigt durch Chromatographie an Agarose-NAD (Fa. Sigma, Deisenhofen). Es wurde das Niederdruck-Chromatographie-System der Fa. Pharmacia verwendet. Das Gelbett betrug 5 ml. Die Chromatographie wurde mit einer Flußrate von 0,5 ml/min durchgeführt. Die Anreicherung ist in Tab. 2 zusammengefaßt.

Tabelle 2 : Anreicherung der Ketoester-Reduktase

| Reinigungsschritt        | Spez.-Aktivität<br>(U/mg) | Gesamt-Ausbeute<br>(%) | Anreicherung<br>(-fach) |
|--------------------------|---------------------------|------------------------|-------------------------|
| Rohextrakt               | 0,6                       | 100                    | 1,0                     |
| 4% PEG-Fällung           | 0,7                       | 75                     | 1,2                     |
| 30% PEG-Fällung          | 2,5                       | 75                     | 4,2                     |
| Q-Sepharose FF           | 40,3                      | 71                     | 67,0                    |
| Ultrafiltration          | 40,3                      | 67                     | 67,0                    |
| Agarose-NAD <sup>+</sup> | 1855,0                    | 67                     | 3091,0                  |

Das scheinbare native Molekulargewicht der Ketoester-Reduktase von 136 kDa ( $\pm$  11 kDa) wurde durch Gelpermeations-Chromatographie an Sephadex G-200 bestimmt. Dabei dienten Thyroglobulin, Ferritin, Katalase, Aldolase, Rinderserumalbumin, Ovalbumin, Chymotrypsinogen A und Ribonuclease A als Eichproteine. Die beiden gleich großen Untereinheiten haben ein scheinbares Molekulargewicht von 67 kDa, wie durch SDS-Gelelektrophorese bestimmt wurde. Als Molekulargewichtsstandard wurde eine Mischung aus  $\alpha_2$ -Makroglobulin, Phosphorylase b, Rinderserumalbumin, Glutamat-Dehydrogenase, Lactat-Dehydrogenase und Trypsininhibitor verwendet.

Je nach unterschiedlicher Herkunft der KERed sind gewisse Abweichungen im Molekulargewicht bei gleichbleibender Funktion (NADH-abhängige Reduktion von  $\beta$ -,  $\gamma$ - und  $\delta$ -Ketoestern) zu erwarten.

### Beispiel 2 : Regulation der Ketoester-Reduktase

Die Regulation der Ketoester-Reduktase wurde untersucht. Dazu wurden Zellen auf unterschiedlichen C-Quellen (s. dazu Beispiel 1; 2) im 200 ml-Maßstab angezogen. Der Zeitpunkt, bei dem die Aktivität der Ketosäure-Reduktase maximal ist, wurde ermittelt und als Erntezeitpunkt festgelegt (s. Fig. 1).

Die spezifische Aktivität der Ketoester-Reduktase für 5-Oxohexansäureethylester ist in Figur 3 in Abhängigkeit vom Wachstum auf unterschiedlichen C-Quellen dargestellt. Die Ketoester-Reduktase von *Candida parapsilosis* unterliegt der Katabolit-Repression. Unter dereprimierenden Bedingungen (0,8% Glucose im Medium) liegt die spezifische Aktivität des Enzyms etwa 36% höher, als unter reprimierenden Bedingungen (5,4% Glucose im Medium). Unter nicht-reprimierenden Bedingungen (2% Glycerin im Medium) ist die spezifische Aktivität etwa 300% höher, als unter reprimierenden Bedingungen. Bei Wachstum auf Dodecansäure wird die Aktivität der Ketoester-Reduktase von *Candida parapsilosis* auf über 700% gesteigert. Der Zusatz eines Ketoesters zum Medium (0,1%) bringt im Fall von Glycerin als C-Quelle eine Steigerung der spezifischen Aktivität auf 350%.

### Beispiel 3 : Charakterisierung der Ketoester-Reduktase

Für die folgenden Versuche wurde partiell gereinigtes Enzym (nach Q-Sepharose-Chromatographie, 67-fache Anreicherung) eingesetzt.

#### A. pH-Abhängigkeit der Umsetzung

Die Abhängigkeit der Aktivität vom pH-Wert wurde bestimmt, indem 5-Oxohexansäureethylester (35 mM) mit NADH (0,2 mM) und 10 ml Enzymlösung bei unterschiedlichen pH-Werten (0,2 M Pufferlösung) gemischt wurden und die Aktivität bei 340 nm (30°C) photometrisch verfolgt wurde. Fig. 4 zeigt die erhaltenen Aktivitätswerte in Abhängigkeit vom pH-Wert, das Optimum für die 5-Oxohexansäureethylester-Reduktion liegt bei pH 7,9

In analoger Weise wurde das pH-Optimum für die Rückreaktion, die 5-Hydroxyhexansäureethylester-Oxidation, gemessen. (R/S)-5-Hydroxyhexansäureethylester (35 mM) wurde in 0,2 M Puffer mit pH-Werten zwischen 4 und 10 gelöst, 0,2 mM NADH und 10 µl Enzymlösung zugesetzt und die NADH-Bildungsrate photometrisch bei 340 nm verfolgt. Fig. 4 faßt die erhaltenen Werte zusammen, das pH-Optimum für die Oxidation liegt bei pH 9,5.

### B. Temperaturabhängigkeit der Reduktion

Zur Bestimmung des Temperaturoptimums der Reduktion wurde die Enzymaktivität zwischen 30 und 60°C gemessen. Der Testansatz enthielt :

|                                |        |
|--------------------------------|--------|
| 5-Oxohexansäureethylester      | 35 mM  |
| NADH                           | 0,2 mM |
| Enzymlösung                    | 10 µl  |
| TEA-NaOH-Puffer, 0,1 M; pH 7,9 |        |

Die KERed aus *C. parapsilosis* hat ein Temperaturoptimum für die Reduktion zwischen 36 und 40°C.

### C. Temperaturoptimum der Oxidation

Zur Bestimmung des Temperaturoptimums der Oxidation wurde die Enzymaktivität zwischen 30 und 60°C gemessen. Der Testansatz enthielt :

|                               |        |
|-------------------------------|--------|
| 5-Hydroxyhexansäureethylester | 35 mM  |
| NAD                           | 0,5 mM |
| Enzymlösung                   | 10 µl  |
| TRIS-HCl-Puffer, 0.1 M, pH 9  |        |

Die KERed aus *C. parapsilosis* hat ein Temperaturoptimum für die Oxidation zwischen 50 und 56°C.

### D. Einfluß verschiedener Reagenzien auf die KERed

Der Einfluß der verschiedenen Metallkationen und Reagenzien auf die Enzymaktivität wurde untersucht, indem der unter Beispiel 3.B beschriebene Testansatz verwendet wurde.

Die Ergebnisse der Inhibitionsstudie sind in Tabelle 3 zusammengefaßt. Auffallend ist, daß das Enzym durch den Chelator o-Phenanthrolin relativ stark, durch EDTA hingegen praktisch nicht gehemmt wird. Offenbar besitzt die Ketoester-Reduktase ein essentielles Metallion, das durch o-Phenanthrolin entfernt wird, was wiederum zum Aktivitätsverlust führt. Die zunehmend starke Hemmung der Ketoester-Reduk-

tase durch Thiol-Reagenzien wie N-Ethylmaleimid, Jodoacetamid, 2,2'-Dithio-Bis(2-nitrobenzoat) und p-Hydroxymercuribenzoat weisen darauf hin, daß das Enzym mindestens eine essentielle SH-Gruppe enthält.

Tabelle 3 : Inhibitionsstudie der KERed aus *C. parapsilosis*

| Verbindung                       | Restaktivität [%] |                    |
|----------------------------------|-------------------|--------------------|
|                                  | 0,1 mM            | 1,0 mM             |
| <u>Metallionen</u>               |                   |                    |
| Hg <sup>2+</sup>                 | 0                 | 0                  |
| Pb <sup>2+</sup>                 | 0                 | 0                  |
| Ag <sup>+</sup>                  | 0                 | 0                  |
| Cu <sup>2+</sup>                 | 0                 | 0                  |
| Ni <sup>2+</sup>                 | 10                | 0                  |
| Zn <sup>2+</sup>                 | 24                | 0                  |
| Sn <sup>2+</sup>                 | 73                | 0                  |
| Co <sup>2+</sup>                 | 38                | 12                 |
| Ca <sup>2+</sup>                 | 78                | 68                 |
| Mn <sup>2+</sup>                 | 84                | 80                 |
| Mg <sup>2+</sup>                 | 91                | 82                 |
| Fe <sup>3+</sup>                 | 100               | n.b. <sup>1)</sup> |
| KCN                              | 100               | 100                |
| <u>Chelatoren</u>                |                   |                    |
| EDTA (1 mM, 10 mM)               | 100               | 80                 |
| 2,2'-Bipyridyl (0,05 mM; 0,5 mM) | 52                | 23                 |
| o-Phenanthrolin                  | 26                | n.b.               |
| <u>Sulphydryl-Reagenzien</u>     |                   |                    |
| p-Hydroxymercuribenzoat          | 0                 | 0                  |
| 5,5'-Dithio-Bis(2-nitrobenzoat)  | 53                | 0                  |
| Jodoacetamid                     | 77                | 17,5               |
| N-Ethylmaleimid                  | 70                | 47                 |
| Methylglyoxal                    | 100               | 34                 |

(Tabelle 3, Fortsetzung)

Sulfhydryl-Schutzreagenzien

|                        |     |     |
|------------------------|-----|-----|
| 1,4-Dithiothreitol     | 100 | 100 |
| Glutathion (reduziert) | 100 | 100 |

Histidine-spezifische Reagenzien

|                       |     |     |
|-----------------------|-----|-----|
| Diethyl. Pyrocarbonat | 100 | 100 |
|-----------------------|-----|-----|

Andere Reagenzien

|                               |      |     |
|-------------------------------|------|-----|
| Ethanol (5%)                  | -    | 30  |
| Triton X-100 (0.1%)           | -    | 100 |
| Pefabloc (Protease Inhibitor) | n.b. | 100 |

---

1) n.b. : nicht bestimmt

**E. Einfluß der Pufferkonzentration auf die Aktivität der KERed**

Der Einfluß der Pufferkonzentration auf die Aktivität der Ketoester-Reduktase wurde getestet. Dazu wurde der in Beispiel 3.B angegebene Testansatz unter Variation der Pufferkonzentration verwendet.

Die Enzymaktivität ist maximal bei einer Molarität des Puffers von 0,1 M.

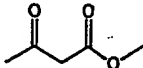
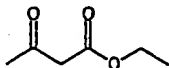
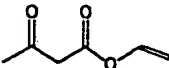
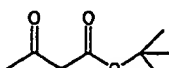
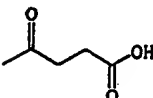
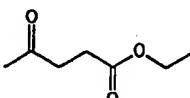
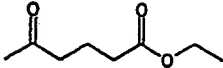
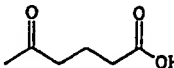
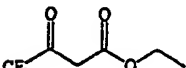
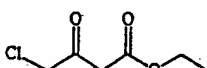
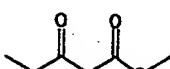
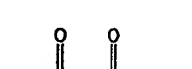
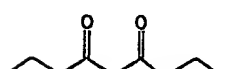

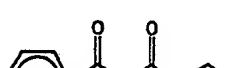

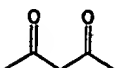
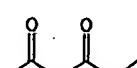
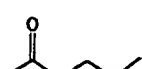
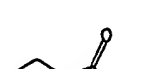

**F. Substratspektrum der KERed**

Entsprechend Beispiel 3.B wurde an Stelle von 5-Oxohexansäureethylester eine Reihe aromatischer und aliphatischer Ketoester, Ketosäuren, Ketone, Diketone und Aldehyde daraufhin untersucht, ob sie enzymkatalysiert reduziert werden können. Dabei wurden die Verbindungen stets in 8 mM Endkonzentration zugesetzt. Die Ergebnisse sind in Tab. 4 zusammengestellt. Es zeigt sich, daß das Enzym eine Vielzahl aromatischer und aliphatischer Oxoverbindungen als Substrat akzeptiert.

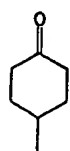
Die Aktivität mit 5-Oxohexansäureethylester wurde willkürlich auf 100% gesetzt.



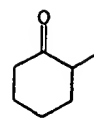
Tabelle 4 : Substratspezifität der KERed aus *C. parapsilosis*

| Verbindung  | Rel. Aktivität [%] | Verbindung   | Rel. Aktivität [%] |
|---|--------------------|--|--------------------|
| <i>Ketosäuren und -ester</i>  |                    |  |                    |
|    | 67                 |    | 76                 |
|    | 61                 |    | 137                |
|    | 0                  |    | 76                 |
|    | 100                |    | 0                  |
|   | 21                 |   | 92                 |
|  | 18                 |  | 32                 |
|  | 51                 |  | 24                 |
|  | 0                  |  | 70                 |
| <i>Diketone</i>   |                    |  |                    |
|  | 15                 |  | 46                 |
|  | 46                 |  | 0                  |
|  | 0                  |  |                    |

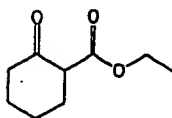
(Tabelle 4, Fortsetzung)

*Alicyclische Ketone*

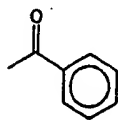
40



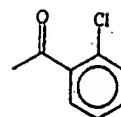
12



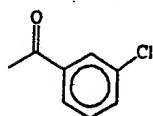
16

*Aromatische Ketone*

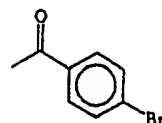
34



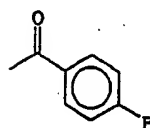
0



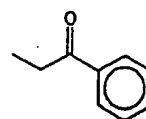
35



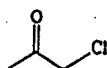
40



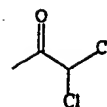
40



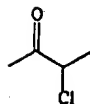
0

*Aliphatische Ketone*

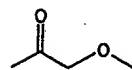
51



60



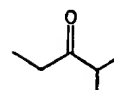
105



53



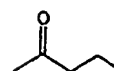
28



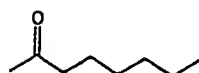
51



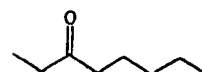
48



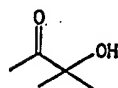
40



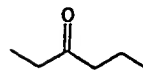
54



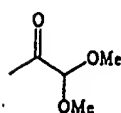
33



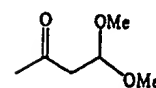
0



4



118

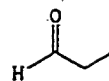


14

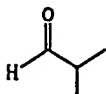
(Tabelle 4, Fortsetzung)

*Aliphatische Aldehyde*

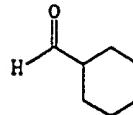
150



127



178



29

$\alpha$ -Ketocarbonsäuren und -ester und Allyl-Ketone werden nicht umgesetzt.

Wie man sieht, ist das Substratspektrum der Ketoester-Reduktase von erheblicher Breite, wobei außer  $\beta$ -,  $\gamma$ - und  $\delta$ -Ketoestern 1,3- und 1,4-Diketone, ggf. substituierte insbes. halogenierte aliphatische, alicyclische und aromatische Ketone, Ketoacetale und Aldehyde akzeptiert werden.

**G. Kinetische Charakterisierung der KERed**

Für ausgewählte Substrate wurden mit Hilfe des oben beschriebenen photometrischen Tests ausgewählte Substrate der KERed aus *C. parapsilosis* kinetisch vermessen. Die Ergebnisse der kinetischen Charakterisierung sind in Tabelle 5 zusammengefaßt.

Tabelle 5 : Kinetische Charakterisierung der KERed

| Nr. | Substrat | $V_{\max}$<br>(%) | $K_m$<br>(mM) | $V_{\max}/K_m$<br>(-) |
|-----|----------|-------------------|---------------|-----------------------|
|-----|----------|-------------------|---------------|-----------------------|

*Aliphatische Ketone*

|   |                                 |     |       |      |
|---|---------------------------------|-----|-------|------|
| 1 | Aceton                          | 97  | 1,060 | 5,5  |
| 2 | Chloroaceton                    | 61  | 0,124 | 29,5 |
| 3 | 1.1-Dichloroaceton              | 45  | 0,176 | 15,3 |
| 4 | Pyrualdehyd -<br>Dimethylacetal | 24  | 0,189 | 7,6  |
| 5 | 2-Butanon                       | 100 | 1,480 | 4,1  |
| 6 | 3-Chlor-2-Butanon               | 50  | 0,442 | 6,8  |

(Tabelle 5, Fortsetzung)

|    |            |    |       |      |
|----|------------|----|-------|------|
| 7  | 2-Pentanon | 62 | 0,141 | 26,4 |
| 8  | 2-Hexanon  | 53 | 0,054 | 58,9 |
| 9  | 3-Hexanon  | 10 | 0,840 | 0,7  |
| 10 | 2-Heptanon | 58 | 0,097 | 35,9 |
| 11 | 3-Heptanon | 11 | 5,6   | 0,1  |
| 12 | 4-Heptanon | 9  | 5,3   | 0,1  |
| 13 | 2-Octanon  | 62 | 0,324 | 11,5 |
| 14 | 3-Octanon  | 12 | 11,20 | 0,1  |
| 15 | 2-Nonanon  | 45 | 0,314 | 8,6  |
| 16 | 2-Decanon  | 20 | 3,960 | 0,3  |

*Aromatische Ketone*

|    |                     |    |       |       |
|----|---------------------|----|-------|-------|
| 17 | Acetophenon         | 22 | 0,049 | 26,9  |
| 18 | 3-Chlor-Acetophenon | 32 | 0,015 | 128,0 |
| 19 | 4-Chlor-Acetophenon | 19 | 0,010 | 114,0 |

*Aldehyde*

|    |             |     |       |      |
|----|-------------|-----|-------|------|
| 20 | Acetaldehyd | 129 | 0,085 | 91,0 |
|----|-------------|-----|-------|------|

*Ketoester*

|    |                                |     |       |      |
|----|--------------------------------|-----|-------|------|
| 21 | Ethyl 3-oxobutanoat            | 79  | 0,122 | 38,9 |
| 22 | Tert.-Butyl 3-oxobutanoat      | 71  | 0,356 | 12,0 |
| 23 | Ethyl 4-Chlor-3-oxobutanoat    | 10  | 3,56  | 0,2  |
| 24 | Ethyl 4-Trifluor-3-oxobutanoat | 11  | 2,0   | 0,3  |
| 25 | Ethyl 3-oxopentanoat           | 17  | 6,9   | 0,1  |
| 26 | Ethyl 3-oxohexanoat            | 5   | 1,3   | 0,2  |
| 27 | Ethyl 4-oxopentanoat           | 12  | 1,73  | 0,4  |
| 28 | Ethyl 5-oxohexanoat            | 116 | 0,89  | 7,8  |

(Tabelle 5, Fortsetzung)

*Primäre und sekundäre Alkohole*

|    |               |                |      |      |
|----|---------------|----------------|------|------|
| 29 | Methanol      | Keine Reaktion |      |      |
| 30 | Ethanol       | 42             | 3,4  | 0,7  |
| 31 | 1-Propanol    | 47             | 3,8  | 0,7  |
| 32 | 1-Butanol     | 47             | 2,9  | 1,0  |
| 33 | 2-Propanol    | 183            | 2,21 | 5,0  |
| 34 | (S)-2-Butanol | 210            | 0,6  | 21,0 |

*Coenzyme*

|    |       |                |       |       |
|----|-------|----------------|-------|-------|
| 35 | NADH  | 105            | 0,038 | 165,8 |
| 36 | NADPH | Keine Reaktion |       |       |

Alle  $V_{\max}$  Werte sind bezogen auf 2-Butanon (6 U/mg, partiell gereinigtes Enzym). Substratinhibition wurde mit Chloroaceton ( $K_{is}$ : 121.3 mM), 3-Hexanon ( $K_{is}$ : 612 mM) und 2-Nonanon ( $K_{is}$ : 24.9 mM) beobachtet. Generell lag der Standardfehler der maximalen Reaktionsgeschwindigkeiten und der Michaelis-Menten-Konstanten zwischen 5-10 Prozent der Werte.

Aus diesen Ergebnissen kann ein Modell für die Substratbindungsstelle der KERed abgeleitet werden. Durch dieses Modell ist eine Vorhersage möglich, ob ein bestimmtes potentiell Substrat von der KERed akzeptiert wird, oder nicht. In Fig. 5 ist das Modell der Substratbindungsstelle dargestellt.

Danach besteht die Substratbindungsstelle aus zwei Bereichen, die sich hinsichtlich Volumen und Hydrophobizität unterscheiden. Die kleine Tasche kann Methyl-, Ethyl- und Propylgruppen aufnehmen. Daneben werden auch substituierte Methylgruppen wie z.B. die Chlormethylgruppe akzeptiert. Die große Tasche kann lange und hydrophobe Reste binden. Wie aus Tabelle 5 hervorgeht, können dies aliphatische Reste bis  $C_8$  sein (s. 2-Decanon). Die große Tasche kann eine Vielzahl auch sterisch anspruchsvoller Reste aufnehmen und bestimmt maßgeblich das außerordentlich breite Substratspektrum des Enzyms.

#### H. Enzymkatalysierte Herstellung von 3-Hydroxybuttersäuremethylester im Batch-Ansatz

Eine Lösung von 3-Oxobuttersäuremethylester (100 mM) wurde mit Ketoester-Reduktase (10 U) und Coenzym (0,1 mM) umgesetzt (100 ml Gesamtvolumen), wobei das Coenzym NADH durch Kopplung mit Natriumformiat (1 M) und Formiat-Dehydrogenase (40 U) regeneriert wurde. In regelmäßigen Abständen wurden Proben entnommen und mit Hilfe der Dünnschicht-Chromatographie (DC) auf gebildeten 3-Hydroxybuttersäuremethylester analysiert. Die Enantiomerenreinheit wurde über GC-Analyse bestimmt.

##### Trennbedingungen der DC :

Stationäre Phase : Kieselgel 60 F254  
Mobile Phase : Diethylether : Petrolether<sub>60-80</sub> = 2 : 1  
Laufstrecke : 5 cm  
Tauchlösung : 10%ige Molybdatophosphorsäure-Hydrat-  
Lösung in Ethanol (abs) mit 4 % HCl  
Verfahren : Aufsteigende Chromatographie bei Kammersättigung  
Probenvolumen : 2-10 µl  
Laufverhalten : Hydroxysäuren/-ester laufen weniger weit als  
Ketosäuren/-ester

Nachdem die Reaktionszeit von 36 Stunden abgelaufen war, wurde zur Bestimmung der Enantiomerenreinheit der Reaktionsansatz mit Chloroform extrahiert, daß ausgefallene Protein abgetrennt und die organische Phase mit Trifluoressigsäureanhydrid (TFAA) derivatisiert. Eine Probe wurde mittels chiraler Gaschromatographie analysiert.

##### Trennbedingungen der GC :

Säule : Lipodex E (25m x 0.25 mm ID)  
Helium : 0,8 bar  
Wasserstoff : 0,5 bar  
Probenvolumen : 1 µl

T<sub>Säule</sub> : 80°C bzw. 90°C

T<sub>Injektor</sub> : 260°C

Retentionszeiten :

3-(R)-Hydroxybuttersäuremethylester 10,5 min

3-(S)-Hydroxybuttersäuremethylester 14,9 min

Die Elutionsreihenfolge der Enantiomeren auf der chiralen GC-Säule wurde mit reinen Enantiomeren von 3-Hydroxybuttersäuremethylester zu (R) vor (S) bestimmt. Die Ergebnisse der GC-Analyse sind in Fig. 6 dargestellt. Die Ketoester-Reduktase aus *Candida parapsilosis* setzt 3-Oxobuttersäuremethylester mit einem Enantiomerenüberschuß von 98% und einer Ausbeute von 95% zu (S)-3-Hydroxybuttersäuremethylester um.

**I. Enzymkatalysierte Herstellung von 5-Hydroxyhexansäureethylester im Batch-Ansatz**

Analog zu Beispiel 3.H wurde 5-Oxohexansäureethylester enzymatisch im präparativen Maßstab reduziert. Proben wurde mittels chiraler Gaschromatographie analysiert (T<sub>S</sub>: 90°C)

Retentionszeiten :

5-(R)-Hydroxyhexansäureethylester 25,0 min

5-(S)-Hydroxyhexansäureethylester 26,9 min

Die Ergebnisse der GC-Analyse sind in Fig. 7 dargestellt. Die Ketoester-Reduktase aus *Candida parapsilosis* setzt 5-Oxohexansäureethylester mit einem Enantiomerenüberschuß von 95% und einer Ausbeute von 96% zu (S)-5-Hydroxyhexansäureethylester um.

## J. Nachweis der Stereospezifität des Enzyms

Zum Nachweis der Stereospezifität des Enzyms und der Enantiomerenreinheit des Produkts wurden zwei Methoden verwendet, einerseits wurde enzymatisch hergestelltes Produkt mit einer chiralen Gaschromatographie, die (*R*)- und (*S*)-Hydroxyester voneinander trennen kann, untersucht, andererseits wurde mit käuflichen, reinen Isomeren von (*R*)- und (*S*)-Hydroxysäureestern sowie (*R*)- und (*S*)-Phenylethanol photometrisch die Oxidationsreaktion gemessen.

### 1. Chirale GC

Die Produkte der enzymatischen Umsetzungen sowie die käuflichen reinen Enantiomeren wurden mit Hilfe der Gaschromatographie an einer chiralen Phase analog zu Beispiel 3.H getrennt. Die Zuordnung der Peaks erfolgte durch Vergleich mit den käuflichen reinen Enantiomeren von 3-Hydroxybuttersäuremethylester. Die Elutionsreihenfolge (*R*) vor (*S*) gilt für die homologe Reihe der Hydroxyester. Fig. 6 zeigt, daß man durch enzymatische Umsetzung zu reinem (*S*)-Hydroxybuttersäuremethylester gelangt.

### 2. Rückreaktion mit (*R*)- bzw. (*S*)-Hydroxyverbindungen

Zum photometrischen Nachweis der Stereospezifität wurden folgende Testansätze durchgeführt :

I) 35 mM (*R*)-Hydroxybuttersäuremethylester  
0.5 mM NAD  
10 µl Enzymlösung  
TRIS-HCl-Puffer, pH 9, 0.1 M

II) 35 mM (*S*)-Hydroxybuttersäuremethylester  
0.5 mM NAD  
10 µl Enzymlösung  
TRIS-HCl-Puffer, pH 9, 0.1 M  
Temperatur : 56°C

III) 8 mM (*R*)-Phenylethanol  
0.5 mM NAD  
10 µl Enzymlösung  
TRIS-HCl-Puffer, pH 9, 0.1 M

IV) 8 mM (*S*)-Phenylethanol  
0.5 mM NAD  
10 µl Enzymlösung  
TRIS-HCl-Puffer, pH 9, 0.1 M



Die Aktivitätsmessung erfolgte photometrisch bei 340 nm.

Ergebnisse :

|              |       |             |       |
|--------------|-------|-------------|-------|
| Ansatz I :   | 7 %   | Ansatz II : | 100 % |
| Ansatz III : | 1,1 % | Ansatz IV : | 100 % |

Das Ergebnis zeigt deutlich, daß das Enzym hochspezifisch für (S)-3-Hydroxybuttersäuremethylester und (S)-Phenylethanol ist.

## P a t e n t a n s p r ü c h e

1. Zur NADH-abhängigen enzymatischen Umsetzung von  $\beta$ -,  $\gamma$ - und  $\delta$ -Ketoestern zu den entsprechenden optisch aktiven  $\beta$ -,  $\gamma$ - und  $\delta$ -Hydroxysäureestern befähigte Ketoester-Reduktase, isolierbar aus Stämmen von *Candida parapsilosis*, *Yarrowinia cellobiosa*, *Rhodococcus erythropolis* oder *Pseudomonas acidovorans*.
2. Ketoester-Reduktase nach Anspruch 1, isoliert aus auf längerkettige(s) Alkansäure(n) bzw. Alkan(e) als C-Quelle enthaltendem Medium gezüchteten Stämmen.
3. Ketoester-Reduktase nach Anspruch 1 oder 2, isoliert aus dem *Candida parapsilosis* Stamm DSM 70 125.
4. Ketoester-Reduktase nach einem der vorangehenden Ansprüche, gekennzeichnet durch folgende Parameter in aufgereinigter Form:
  - ein pH-Optimum für die Ketoester-Reduktion zwischen pH 7,8 und 8,0 und für die Rückreaktion um pH 9,5;
  - ein Temperatur-Optimum zwischen 36 und 40°C für die Reduktion von Ketoestern, und von 50 bis 56°C für die Rückreaktion;
  - rasche Desaktivierung durch  $\text{Hg}^{2+}$ -,  $\text{Pb}^{2+}$ -,  $\text{Ag}^{+}$ -,  $\text{Cu}^{2+}$ -,  $\text{Ni}^{2+}$ -,  $\text{Sn}^{2+}$ - und  $\text{Co}^{2+}$ -Ionen, starke Inhibierung durch p-Hydroxymercuribenzoat, 5,5'-Dithio-Bis(2-nitrobenzoat) und Jodacetamid sowie durch die Chelatoren 2,2'-Bipyridyl und o-Phenanthrolin und Stabilisierung durch SH-Schutzreagenzien wie Dithiothreitol;
  - zusätzliche Befähigung zur Reduktion von aliphatischen, alicyclischen und aromatischen Ketonen, Diketonen, Ketalen und Aldehyden sowie zur Oxidation von primären und sekundären Alkoholen.
5. Verfahren zur enzymatischen Reduktion von Oxo-Verbindungen unter Bildung optisch aktiver S-Hydroxyverbindungen, dadurch gekennzeichnet, daß man die Oxo-Verbindung in Gegenwart von NADH mit Hilfe von Ketoester-Reduktase nach einem der Ansprüche 1 - 4 umsetzt.

6. Verfahren zur Herstellung optisch aktiver R-Hydroxy-Verbindungen durch eine enzymatische Oxidation mit Ketoester-Reduktase nach einem der Ansprüche 1 - 4,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß man von einem Racemat von R- und S-Hydroxy-Verbindungen ausgeht und das S-Enantiomere enzymatisch in die Oxo-Verbindung überführt und abtrennt.
7. Verfahren zur Gewinnung von Ketoester-Reduktase mit Befähigung zur NADH-abhängigen enzymatischen Umsetzung von  $\beta$ -,  $\gamma$ - und  $\delta$ -Ketoestern zu den entsprechenden optisch aktiven  $\beta$ -,  $\gamma$ - und  $\delta$ -Hydroxysäureestern,  
gekennzeichnet durch,  
Kultivierung von Stämmen von *Candida parapsilosis*, *Yarrowinia cellobiosa*, *Rhodococcus erythropolis* oder *Pseudomonas acidovorans* und Isolierung des von den Mikroorganismen gebildeten Enzyms aus dem Zell-Rohextrakt durch fraktionierte PEG-Fällung.
8. Verfahren nach Anspruch 7,  
gekennzeichnet durch  
nachfolgende chromatographische Auftrennung zur weiteren Aufreinigung des Enzyms.

1 / 7

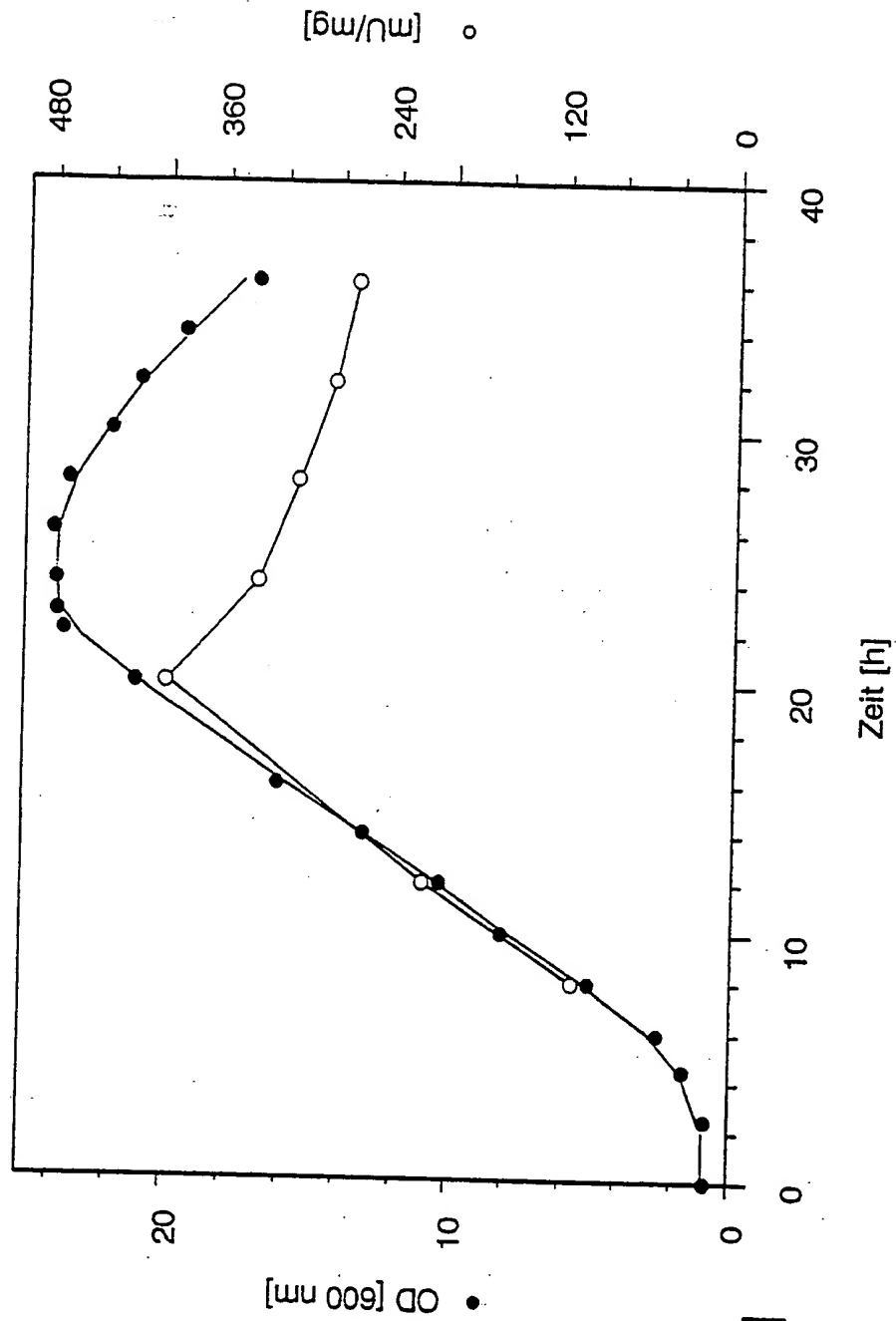


Fig. 1

2 / 7

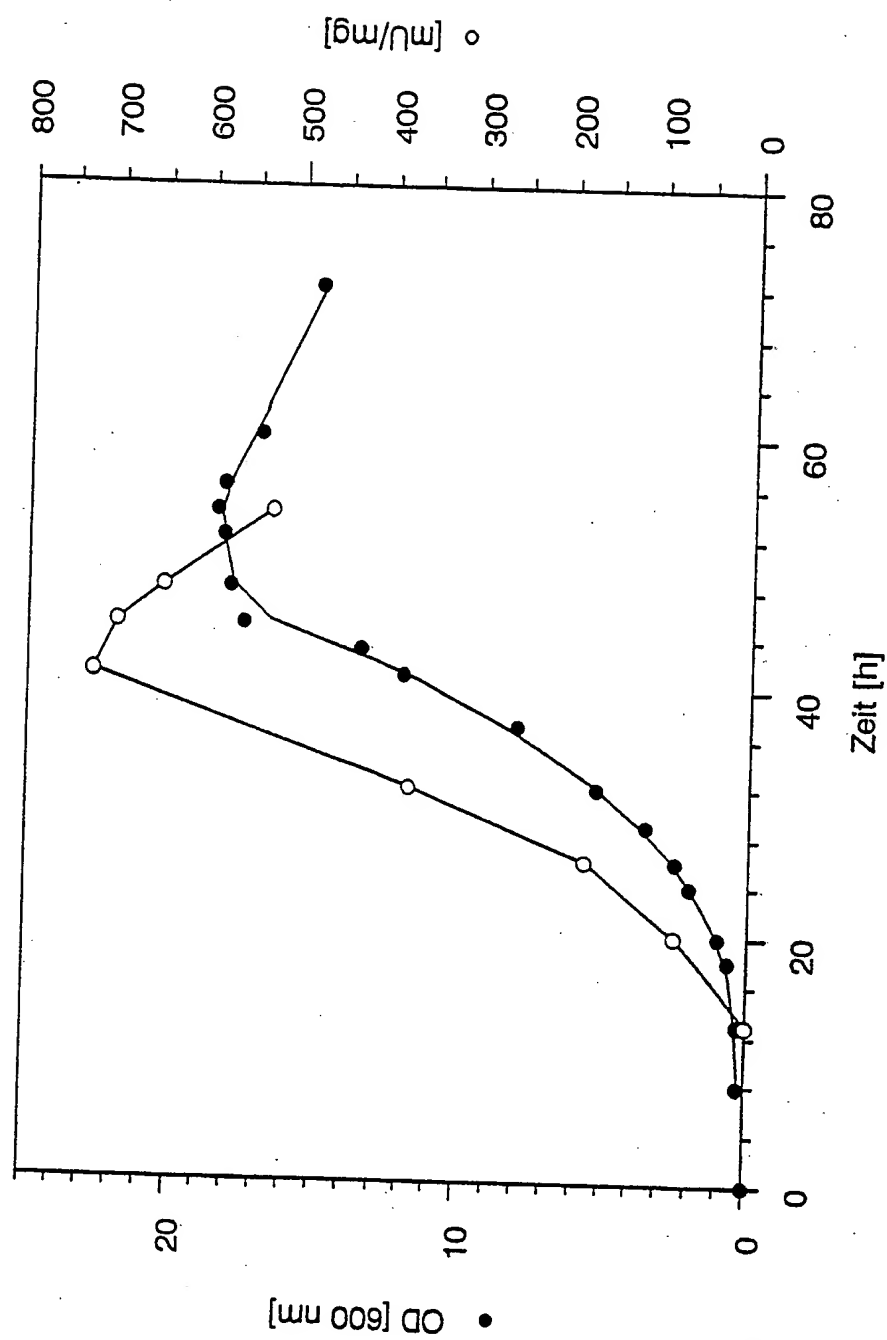


Fig. 2

3 / 7

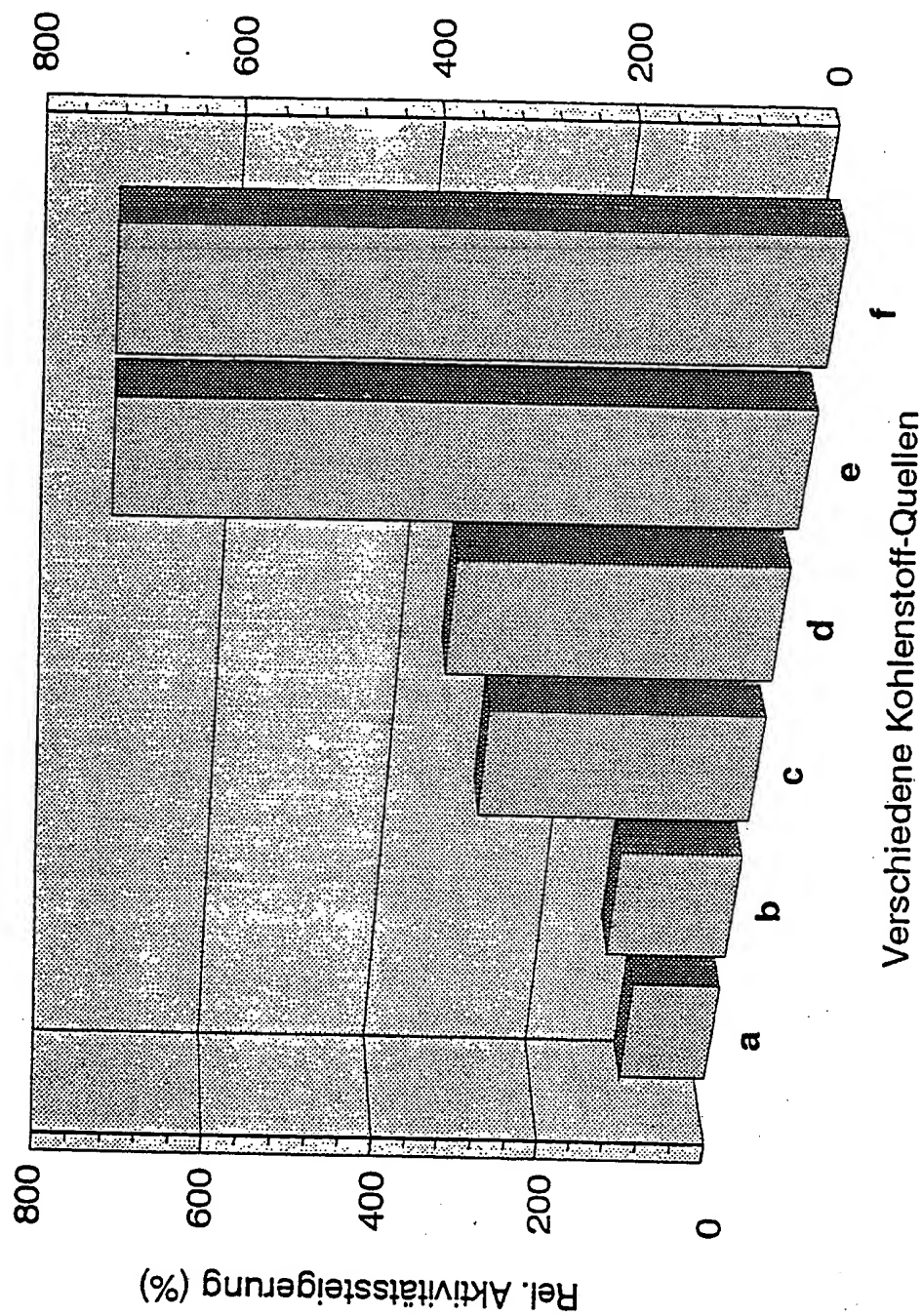
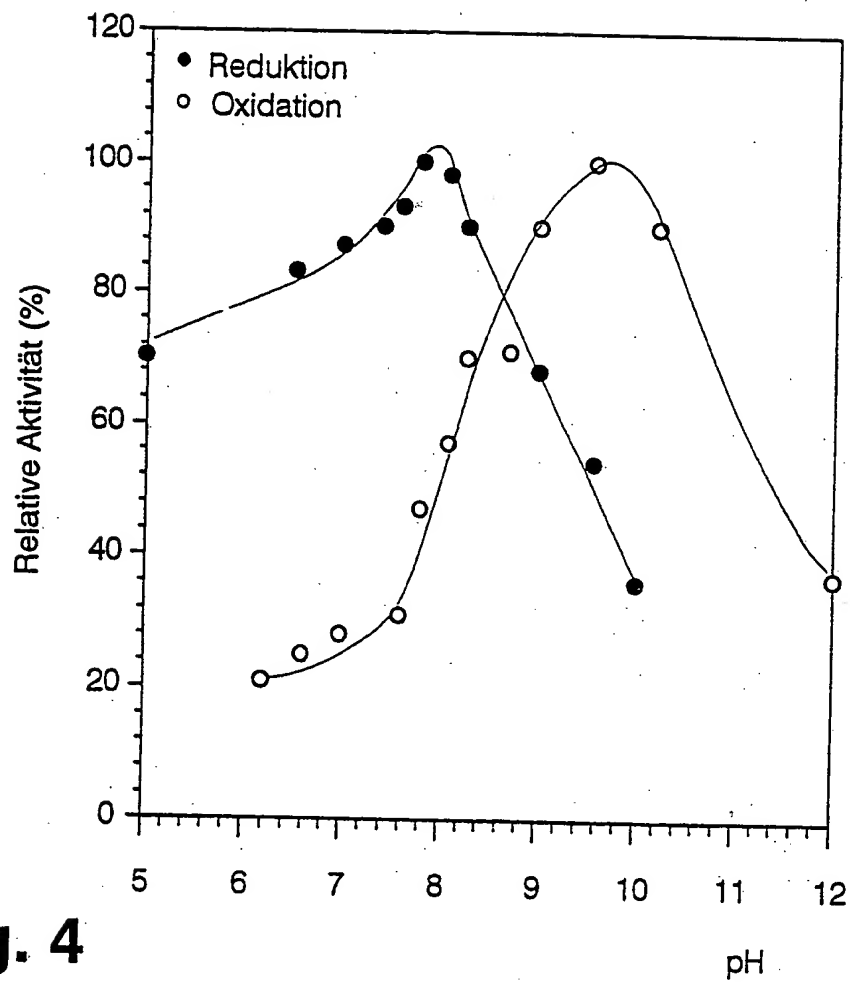


Fig. 3

4 / 7

**Fig. 4**

5 / 7

Große Tasche

Kleine Tasche

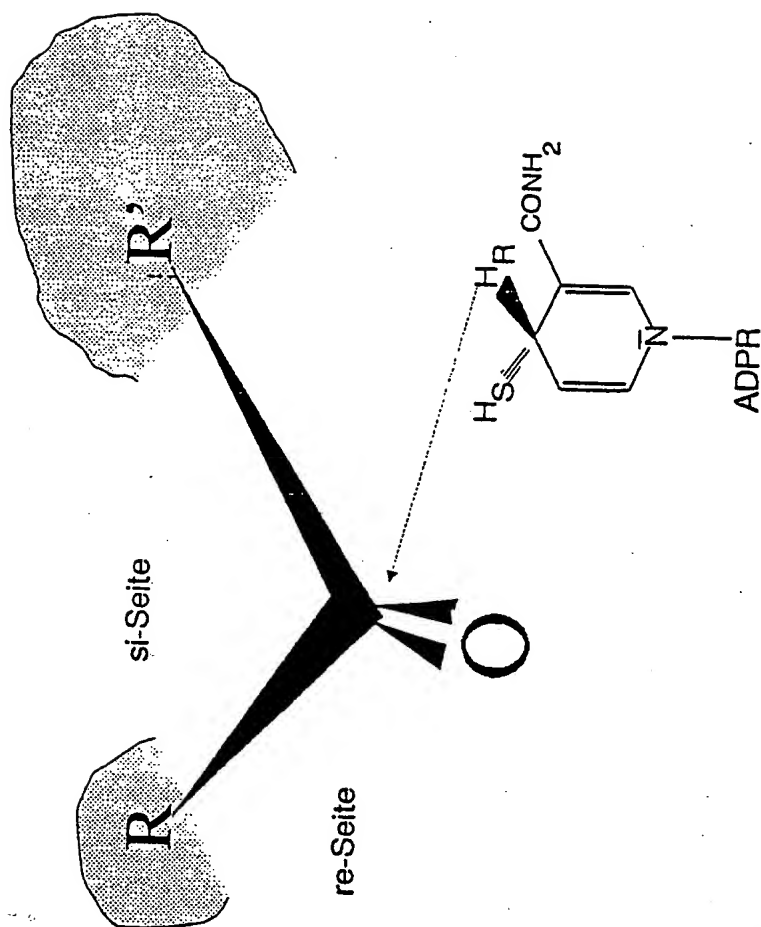
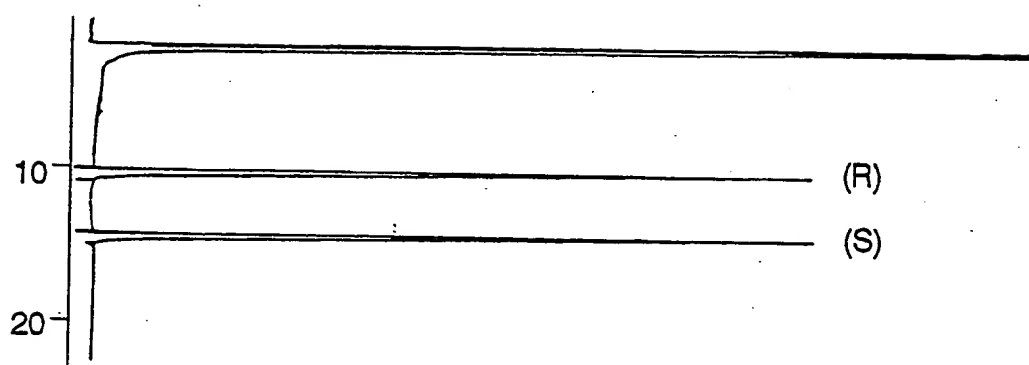
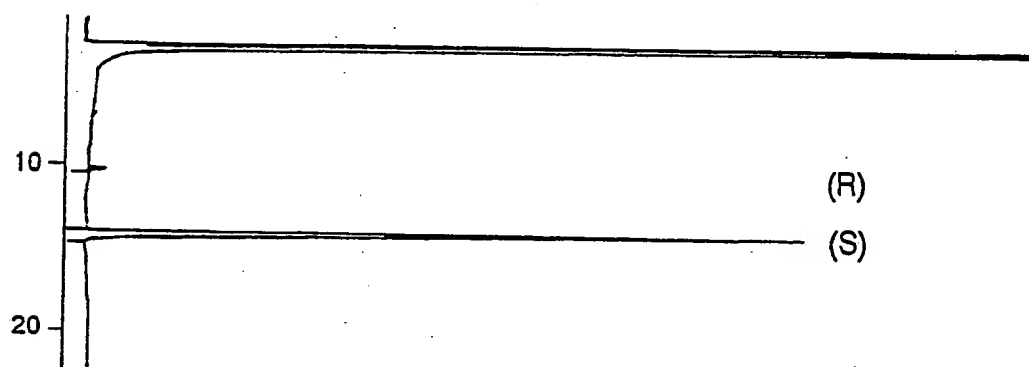


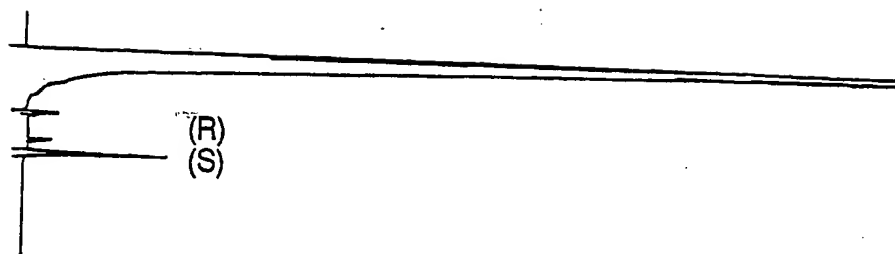
Fig. 5



6 / 7

**Fig. 6a****Fig. 6b**

7 / 7



**Fig. 7**

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/DE 93/00198

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl. 5 C12N 9/02, C12P 7/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl. 5 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

MEDLINE, BIOSIS, WPI, CLAIMS

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No. |
|-----------|---|-----------------------|
| X         | Dialog Information Services, File 155, Medline,<br>Dialog accession No.02804302, Medline accession<br>No. 75211302, Utting JM et al: "Structural, kinetic,<br>and renaturation properties of an induced hydroxy-<br>pyruvate reductase from Pseudomonas acidovorans",<br>J Biol Chem Jul 10 1975, 250 (13) p5233-42<br><br>-- | 1-8                   |
| P,X       | Dialog Information Services, File 5, BIOSIS,<br>Dialog accession No. 10061149, BIOSIS accession<br>No. 95061149, PETERS J et al: "STUDIES ON THE<br>DISTRIBUTION AND REGULATION OF MICROBIAL KETO ESTER<br>REDUCTASES", APPL MICROBIOL BIOTECHNOL 38 (3), 1992,<br>334-340<br><br>--<br>-----                                 | 1-8                   |

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

## \* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

28 June 1993 (28.06.93)

Date of mailing of the international search report

21 July 1993 (21.07.93)

Name and mailing address of the ISA/

EUROPEAN PATENT OFFICE

Authorized officer

## A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPC5: C12N 9/02, C12P 7/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPC5: C12N

Recherche, aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

MEDLINE, BIOSIS, WPI, CLAIMS

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile   | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|--|--------------------|
| X          | Dialog Information Services, File 155, Medline, Dialog accession no 02804302, Medline accession no. 75211302, Utting JM et al: "Structural, kinetic, and renaturation properties of an induced hydroxypyruvate reductase from Pseudomonas acidovorans", J Biol Chem Jul 10 1975, 250 (13) p5233-42 | 1-8                |
| P,X        | Dialog Information Services, File 5, BIOSIS, Dialog accession no. 10061149, BIOSIS accession no. 95061149, PETERS J et al: "STUDIES ON THE DISTRIBUTION AND REGULATION OF MICROBIAL KETO ESTER REDUCTASES", APPL MICROBIOL BIOTECHNOL 38 (3), 1992, 334-340  | 1-8                |

☐ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen.☐ Siehe Anhang Patentfamilie:

## \* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen:

- \*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- \*E\* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- \*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- \*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- \*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

- \*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- \*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- \*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
- \*Z\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

28. Juni 1993

21. 07. 93

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Bevollmächtigter Bediensteter

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL-2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040. Tx. 31 651 000 nl.

JONNY BRUN